UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — **FACULTÉ DE PHARMACIE**

Année 1937-1938 — **N° 183**

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU LAIT CAILLÉ BULGARE

(Yogourth)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 20 décembre 1937
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université

(**Mention Pharmacie**)

par

M. DIKOFF

Pharmacien diplômé de l'Université de Strasbourg

MM.

Examinateurs de la Thèse :
- A. SARTORY, Professeur, Président
- P. CORDIER, chargé de cours, Juge
- R. SARTORY, chargé de cours, Juge

TOUL
IMPRIMERIE TOULOISE
14, RUE MICHATEL

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — **FACULTÉ DE PHARMACIE**

Année 1937-1938 — **N° 183**

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU LAIT CAILLÉ BULGARE

(Yogourth)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 20 décembre 1937
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université

(**Mention Pharmacie**)

par

M. DIKOFF

Pharmacien diplômé de l'Université de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse : MM.
A. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, chargé de cours, Juge
R. SARTORY, chargé de cours, Juge

TOUL
IMPRIMERIE TOULOISE
14, RUE MICHATEL

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✿, C. ❁
VOLMAR, *Assesseur*, ✿
CUVIER, *Secrétaire*, I. ✿

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁

PROFESSEURS

MM. A. SARTORY, C ✻, I. ✿, C. ❁ . .	Bactériologie.
LAVIALLE, ✻, I. ✿, ❁	Botanique.
VOLMAR, I. ✿.	Chimie organique.
GUILLAUME, ✻, ⚕, I. ✿, ❁ . .	Pharmacie galénique.
LAPP, I. ✿.	Chimie analytique.
CORDIER, chargé de cours, ✿.	Pharmacie chimique.
R. SARTORY, ch. de cours, ✿.	Matière médicale.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM. A. SARTORY.	Hygiène.
LAVIALLE.	Hydrologie.
VOLMAR.	Chimie minérale.
GUILLAUME.	Zoologie.
LAPP.	Physique.
EISENMANN.	Législation et Déontologie.
CORDIER.	Chimie biologique.
R. SARTORY.	Cryptogamie.
DUQUENOIS.	Toxicologie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. R. SARTORY.	Bactériologie et Parasitologie.
COLLARD, I. ✿, ⚕.	Chimie pharmaceutique
BOHN A. ✿.	Histoire naturelle.
DUQUENOIS.	Chimie et Physique.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A mon Président de Thèse

Monsieur A. SARTORY,
Doyen de la Faculté de Pharmacie
de Strasbourg,
Commandeur de la Légion d'Honneur

A mes Juges

Monsieur P. CORDIER,
Chargé de Cours
à la Faculté de Pharmacie
de Strasbourg

Monsieur R. SARTORY,
Chargé de Cours
à la Faculté de Pharmacie
de Strasbourg

HOMMAGE TRES RESPECTUEUX

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548005_0061

A la mémoire de mes Parents bien-aimés,

A ma Femme et mon Fils,

A mon Beau-Père,

A mes Sœurs et mon Frère,

A Ceux qui me sont chers,

EN GAGE DE MA PLUS VIVE AFFECTION
ET DE MA SINCERE RECONNAISSANCE

INTRODUCTION

Ce qui m'a déterminé à faire choix de ce sujet, c'est surtout la grande consommation du Yogourth dans mon pays (la Bulgarie) ; sa préparation relativement facile peut être effectuée par la population même, son action incontestable comme moyen curatif, diétique et préventif contre beaucoup de maladies sont sûrement les causes principales de cet emploi très répandu.

L'étude du Yogourth est intimement liée à celle des ferments lactiques. Les recherches au sujet de ces ferments qui ont été pour la première fois nettement démontrés par Pasteur sont encore beaucoup plus obscures que celles des ferments acétiques étudiés eux aussi pour la première fois par Pasteur. Les ferments lactiques transforment les matières sucrées en acide lactique. Les microbes qui engendrent ces réactions sont très nombreux, et produisent, au cours du dédoublement et de la dégradation des substances très variées qu'ils attaquent, de l'acide lactique en petites quantités.

Dans la classification des ferments acétiques on a limité cette qualification aux bactéries qui ont un pouvoir fermentatif acétique très prononcé et dont le taux d'acétification est très élevé. Les mêmes idées devraient être appliquées à la fermentation lactique. On ne doit évidemment pas considérer comme un ferment lactique une bactérie qui ne produit que de faibles quantités d'acide lactique. Cette formation n'est souvent qu'une propriété secondaire accessoire s'effaçant très souvent devant d'autres plus importantes. Les quantités d'acide lactique formées par un grand nombre de bactéries sont souvent trop minimes pour coaguler le lait ; souvent elles ne contribuent que dans une faible mesure à la coagulation véritablement dûe à l'action concomitante d'une présure ou d'une acidification intense du milieu.

Nous mentionnons à ce sujet les pneumocoques, les streptocoques pyogènes, le staphylocoque doré et de nombreux autres microbes auxquels on ne doit naturellement pas attribuer la qualité de ferments lactiques.

Les colibacilles, pneumobacilles, le Bacillus lactis aerogenes, qui produisent de l'acide lactique à partir des matières hydrocarbonées en plus grande quantité ne doivent sûrement pas être considérés non plus comme des ferments lactiques puisque cette substance peut être envisagée comme un sous-produit d'autres actions biochimiques plus importantes de ces bactéries.

Nous pouvons donc émettre pour les ferments lactiques vrais la définition suivante: doivent être considérés comme microbes déterminant une fermentation lactique proprement dite uniquement les germes donnant un taux élevé de 80 à 98 % de rendement en acide lactique par rapport au sucre introduit dans le milieu. On peut naturellement admettre des rendements inférieurs entre 40 et 50 % et même au-dessous à la condition qu'ils restent importants et pratiquement utilisables.

C'est dans l'application de cette définition qu'on peut espérer voir mettre un peu d'ordre dans l'étude des bactéries de la fermentation lactique.

Les différents germes que nous avons isolé du lait caillé bulgare que nous avons eu l'occasion d'étudier au cours de ce travail ont été soumis à cette épreuve et nous ne décrirons ici que les microbes répondant aux conditions précitées ; ce sont donc des ferments lactiques proprement dits que nous envisageons dans cette étude.

Celle-ci se divise en deux parties. Dans la première, nous nous sommes attachés à donner un aperçu général sur l'historique des ferments lactiques, et des autres fermentations microbiennes.

Dans le premier chapitre, nous envisageons succinctement l'étude de la fermentation alcoolique. Dans le chapitre II, nous étudions l'histoire de la fermentation acétique et du vinaigre en général. Le chapitre III a trait à la fermentation butyrique et aux microbes occasionnant la dégradation des substances complexes vers l'acide butyrique. Dans le chapitre IV, nous entreprenons enfin l'étude historique détaillée des ferments lactiques.

Le V[e] chapitre de notre travail est consacré à l'étude du produit de base utilisé pour la fabrication du lait caillé bul-

gare, nous avons dit: le lait et ses sous-produits le beurre et surtout les fromages.

La deuxième partie de notre étude est destinée à l'exposé de nos recherches personnelles.

Nous rapportons les différentes techniques utilisées pour la fabrication du Yogourth et les conditions nécessaires pour le bon développement des microbes intervenant dans la formation du Yogourth.

Un deuxième chapitre est destiné à la description des techniques utilisées par nous pour l'isolement des différents germes, agents de la coagulation du lait et de la fabrication des laits caillés. Dans le même chapitre nous étudions les différents agents intervenant principalement dans la préparation du Yogourth.

Un chapitre est ensuite consacré à l'étude du lait caillé et de la levure bulgare en application à la thérapie humaine et pour les traitements des plaies en général.

Des conclusions générales, bactériologiques et thérapeutiques, condensent sous une forme succincte les résultats de nos recherches.

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, nous prions Monsieur le Professeur A. Sartory, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui nous a conseillé d'entreprendre ce travail et qui nous a prodigué constamment son appui, de croire à l'expression de notre respectueux attachement et de notre vive gratitude pour les preuves souvent renouvelées de sa bienveillance au cours de notre séjour à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Nous adressons également le témoignage de notre reconnaissance à Monsieur P. Cordier ainsi qu'à Monsieur René Sartory, chargés de cours, qui ont bien voulu faire partie du Jury de notre thèse.

Nous devons des remerciements très particuliers à Monsieur Jacques Meyer, assistant à la Faculté de Pharmacie, qui a bien voulu mettre à notre disposition son savoir et sa compétence.

Nous tenons enfin à remercier Messieurs les Professeurs bulgares, dans les travaux desquels nous avons pu trouver des renseignements très utiles et documentés pour l'étude du lait caillé bulgare.

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE PREMIER

L'Histoire de la Fermentation

L'utilisation consciente de la fermentation, ce facteur important pour l'humanité, ainsi que les agents de cette fermentation n'ont pas été connus dans les temps anciens. On a eu une idée vague sur les processus digestifs et les produits de dégradation qui en résultent. Le nom fermentation a été assez populaire dans le moyen-âge, car les alchimistes allemands confondaient la fermentation proprement dite avec les produits organiques résultant de la digestion.

Au dix-septième siècle, Scheele et d'autres chimistes ont essayé de limiter les processus de la fermentation et d'en établir une définition. Ils n'ont considéré cependant que quelques rares produits et il est facilement compréhensible que leur raisonnement a dû être erroné puisque le monde des microorganismes vecteur des processus enzymatiques n'a pas encore été connu à ce moment-là. Le Hollandais Lewenhocken a essayé d'effectuer des recherches sur divers produits au moyen d'un microscope primitif inventé par lui-même. Ces observations et descriptions, relativement exactes des microbes que cet auteur a pu donner, ont servi de base pour les études ultérieures dans ce domaine ; mais malgré ces premiers efforts les véritables agents de la fermentation sont restés pendant très longtemps encore inconnus. Ce n'est qu'en 1857 que Pasteur a découvert les bacilles du lait caillé et a prouvé que ces microorganismes sont les véritables vecteurs spécifiques pour les différents processus de fermentation.

L'école de Pasteur a pu bientôt montrer que les dégradations enzymatiques étaient dûes à des ferments solubles,

secrétés dans le milieu ambiant par les bactéries mêmes. D'autre part ces germes renferment des endoferments. Il faut donc distinguer entre des ferments vivants (bacilles, champignons, etc...) et des ferments exogènes indépendants de la vie cellulaire.

Nous n'envisagerons ici que les ferments les plus importants utilisés pour la production de substances alimentaires de premier choix pour l'humanité.

FERMENTATION ALCOOLIQUE

La fermentation alcoolique est aujourd'hui industriellement utilisée pour la fabrication de liquides alcooliques, de l'alcool lui-même et de la levure. Les différentes techniques utilisées dans l'industrie sont strictement adaptées aux propriétés des matières premières qu'on met en œuvre et aux installations techniques et appareillages qu'on emploie pour la fabrication des aliments alcooliques. C'est pour cette raison que nous nous permettons de décrire ici les différents procédés de fermentation alcoolique suivant les produits alimentaires qui en résultent.

La Bière

La bière est le produit de la fermentation alcoolique d'une infusion d'orge germée ou malt, enrichie par décoction des principes aromatiques et des résines du houblon. Pendant la germination de l'orge, l'amidon de réserve est transformé sous l'influence d'une diastase en substance sucrée fermentescible (sucre et dextrine). Nous empruntons cette définition à Leprince et Lecoq dans le traité desquels nous avons puisé aussi les quelques données de préparation qui suivent :

La préparation de la bière se fait en plusieurs temps : le maltage comprend la préparation de l'orge pour obtenir les matières hydrocarbonées fermentescibles. L'orge est soigneusement triée, lavée, puis versée dans des cuves où s'effectue la trempe ou gonflage, en présence de l'eau qui est plusieurs fois renouvelée. La trempe est suffisante quand l'orge a absorbé 50 % de son poids d'eau. Celle-ci est ensuite disposée au germoir dont l'atmosphère est saturée de vapeur d'eau et dont la température est maintenue successivement à + 15°, + 20°, + 30° et + 34°.

Au bout de huit à vingt jours, c'est-à-dire dès que les tigelles ont atteint une longueur égale à une fois et demie celle du grain, l'orge germée ou malt vert, est placé dans un grenier, où passe un courant d'air pendant dix ou douze heures, là, elle se refroidit et commence à se dessécher. La dessiccation est achevée dans une étuve appelée touraille, traversée par de l'air chaud qui élève progressivement la température jusqu'à + 80° ou + 95°, suivant la qualité du malt employé et la nature de la bière à obtenir. Les couches de grains, disposées sur des plateaux dont les fonds sont en tôle perforée, sont remuées par un retourneur mécanique. Le malt doit abandonner dans la touraille 40% d'eau; on le conserve ensuite dans un endroit sec.

Il faut qu'un bon malt contienne au plus 5 % d'eau et qu'il fournisse au moins 70 % d'extrait, son amidon doit être saccharifié par l'eau tiède en 3/4 d'heure au maximum.

Brassage. — Cette opération a pour but la préparation du moût, liquide sucré, susceptible de fermenter. L'eau chaude permet à la diastase d'achever la transformation de l'amidon en maltose et dextrine, transformation déjà commencée par le maltage.

Le malt est d'abord réduit en farine grossière dans un concasseur, puis on procède à l'empâtage de cette farine dans une cuve de tôle appelée macérateur, où la masse est brassée par un agitateur à bras hélicoïdaux ou vagueur. La saccharification du moût se fait par infusion ou par décoction.

Dans le procédé par infusion, on épuise le malt par des additions successives d'eau chaude, la température ne doit pas dépasser + 70° ; on prépare ainsi les bières qui doivent être soumises à la fermentation haute.

Le procédé bavarois ou par décoction comporte trois opérations ou trempes. La première trempe, représentant le tiers de la masse du liquide contenu dans le macérateur, est portée à l'ébullition pendant une demi-heure, puis renvoyée au macérateur. Cette opération est répétée deux fois encore. Les bières obtenues par ce procédé sont moins alcooliques que celles préparées par infusion, plus épaisses et contiennent plus de dextrine et moins de maltose. Par filtration, le moût est séparé des drèches, résidu solide employé à l'alimentation du bétail.

Cuisson et houblonnage. — Le moût filtré subit ensuite

la cuisson dans des chaudières spéciales et le houblonnage. L'ébullition transforme les dernières portions d'amidon du moût en dextrine et coagule une partie des matières albuminoïdes. Le houblon, projeté à la surface du liquide dès l'apparition des premiers bouillons, aide à sa clarification par précipitation d'une autre fraction des matières albuminoïdes, le stérilise, et lui donne de l'arôme et de la couleur. Les chaudières sont fermées par un dôme pour éviter la perte en huiles essentielles.

Pour les bières de fermentation haute, la durée de cuisson est de 5 à 8 heures et la dose de houblon de 350 grammes par hectolitre ; pour les bières de fermentation basse, deux heures d'ébullition et 200 grammes de houblon par hectolitre suffisent. La bière Pilsen exige 400 à 500 grammes de houblon doux de Bohême et une courte ébullition.

Le moût, au sortir de la chaudière, traverse un panier à houblon qui retient les folioles, les cônes et les matières albuminoïdes.

Fermentation. — Le moût est transvasé dans des bacs à grande superficie et étalé en couches de faible épaisseur ; il se refroidit lentement, s'oxyde et se clarifie.

La fermentation basse s'obtient en mélangeant 300 grammes de levure pressée à 100 litres de moût refroidi à + 6° dans une grande cuve appelée guilloire. Au bout de 24 heures, un premier dépôt des matières en suspension s'étant opéré, le moût est recueilli dans de très grandes cuves dont la température est réglée par un serpentin dans lequel circule de l'eau à + 1°. La température s'élève à + 10° au bout de 4 jours, puis décroît jusqu'à + 4° ou + 5°. On écume les mousses et résines brunes et la fin de la fermentation est marquée par la formation d'une sorte de couvercle qui isole la bière du contact de l'air. La levure se dépose au fond ; on soutire la bière que l'on conserve dans des caves où règne une température de + 1° et où s'effectue la fermentation secondaire. La mousse sort par la bonde des fûts, que l'on bouche ensuite pour régler la pression du gaz carbonique.

Pour la fermentation haute, beaucoup moins coûteuse, on délaie de 120 à 250 grammes de levure par hectolitre de moût maintenu à + 20°, on soutire peu de temps après dans

des fûts et la fermentation est terminée quand il ne s'échappe plus de mousse.

La fermentation mixte s'opère à la température de + 17° dans les cuves et de + 10° à + 12° dans les caves, elle donne des bières d'excellente qualité.

Clarification. — La bière est clarifiée par collage au moyen de gélatine, de colle de poisson, de gélose, de mousse d'Islande ou d'alumine gélatineuse (cette dernière substance donne des bières très peu colorées). L'addition au moût d'indinglass ou de lichen dans la chaudière à houblonner assure un collage parfait et définitif.

Bières diverses. — Petites bières. — Les petites bières sont préparées en épuisant par l'eau les drèches provenant du brassage et en employant le houblon ayant déjà servi à la préparation de la bière ; on les additionne souvent de glucose et de dextrine avant la fermentation.

Bières blanches. — Bières de mars. — Bières de saison. — Ces différentes bières de couleur claire sont obtenues avec des malts additionnés d'orge non maltée ou de froment.

Nous dirons quelques mots sur les principes de la fabrication des bières : les levures qui sont les principaux agents de la fermentation alcoolique, sont incapables de produire des ferments qui attaquent les membranes de graines d'orge. Pour cette raison on fait donc tout d'abord germer les graines. Au cours de ces procédés, l'orge fournit même différents enzymes qui dissolvent les membranes cellulosiques: la cytase, puis une diastase qui transforme les matières amylacées en dextrine et en maltose. Weis a démontré qu'il existe aussi une peptase, capable de transformer les matières protidiques supérieures en albumoses. D'autre part, on a pu démontrer l'existence d'une tryptase qui dégrade les albumoses en substances albuminoïdes encore plus simples: peptones et acides aminés.

Mais les matières essentielles pour la fabrication de la bière sont la dextrine et la maltose qui sont attaquées par les levures lors du processus dé la fermentation alcoolique.

La fermentation alcoolique des glucides est connue depuis des temps très reculés. Le véritable inventeur doit-être, si l'on en croit la Bible, Noé. Il faut arriver en 1240 au Monpelliérain

Arnaud de Villeneuve pour connaître exactement l'alcool et pour l'isoler par la distillation. Les progrès de cette préparation se font ensuite très lentement et c'est seulement en 1789 que Lavoisier a montré que le glucose se décompose dans la fermentation alcoolique et libère du gaz carbonique et de l'alcool ; le gaz carbonique se dégage et dans le moût, dans la solution, reste l'alcool. Gay-Lussac donne, en 1810, pour la première fois, la formule globale de la fermentation alcoolique: à partir d'une molécule de glucose résulte deux molécules de gaz carbonique et deux molécules d'alcool :

$$C^6H^{12}O^6 = 2\ CO^2 + 2\ CH^3.\ CH^2OH.$$

Par ces travaux on avait donc établi le produit d'origine et les deux produits terminaux. Dans la nature les choses ne se passent cependant pas ainsi et il y a des étapes intermédiaires lors du processus diastasique. Ceux-ci ont été reconnus par l'isolement de composés dérivant du glucose au cours de fermentations inhibées en cours de route par l'intervention de substances étrangères. On aboutit ainsi soit à des fermentations arrêtées, soit à des fermentations déviées. A l'heure actuelle, on est d'accord pour ne conférer la qualité de composés intermédiaires qu'aux seuls composés: 1°) qui dérivent directement ou indirectement du glucose ou des glucides mis en œuvre ; 2°) qui sont directement fermentescibles, c'est-à-dire dégradables par la levure elle-même ou les diastases extraites de celle-ci. On a été conduit à envisager dans le cas de la fermentation alcoolique du glucose, trois intermédiaires principaux :

a) Des composés phosphoriques du glucose ;

b) L'acide pyruvique et l'aldéhyde correspondant ;

c) L'aldéhyde acétique.

Les cinq formes de fermentation par la levure de bière (1).

" Tels sont les termes intermédiaires de la fermentation alcoolique. Cette fermentation alcoolique type pourra d'ailleurs être changée suivant les circonstances, suivant les conditions de milieu dans lesquelles on forcera la levure à travailler, et nous pourrons avoir alors des fermentations alcooliques, des fermentations de glucose, suivant plusieurs types, et c'est l'étude de ces types qui a permis d'entrevoir les composés intermédiaires de la fermentation alcoolique.

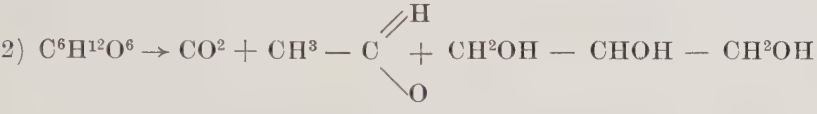
(1) Cristol : *Précis de Chimie Biologique médicale.*

Il y a, suivant les travaux de Neuberg, cinq types de fermentation du glucose.

Le premier type est le mode de fermentation de Gay-Lussac et de Lavoisier, dans lequel entrent comme composés finals, l'alcool et le gaz carbonique.

(1) $C^6 H^{12} O^6 \rightarrow 2\ CO^2 + 2\ CH^3 — CH^2OH.$

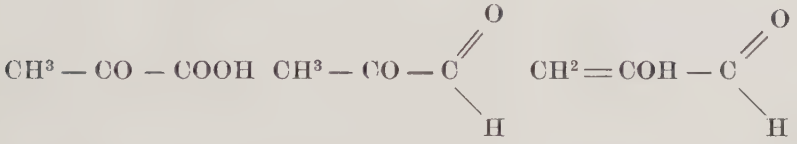
Le deuxième mode de fermentation est celui dans lequel on force la levure à travailler dans un milieu sulfité, soit avec du sulfite de soude ou du bisulfite de soude. L'on obtient justement le glycérol, qu'avait trouvé Pasteur, toujours en très petite quantité dans la fermentation alcoolique ordinaire, du gaz carbonique et de l'aldéhyde acétique :



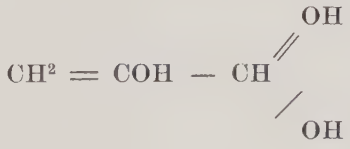
Acétaldéhyde Glycérol

L'aldéhyde acétique provient de l'action de la carboxylase sur l'acide pyruvique primitivement produit et ne peut pas être réduit en alcool parce qu'il est fixé par le sulfite de soude.

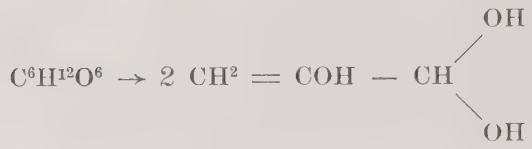
Le mécanisme intime des réactions semble être le suivant: la molécule de glucose se scinde en deux molécules d'hydrate d'aldéhyde pyruvique dont nous rappelons la constitution :



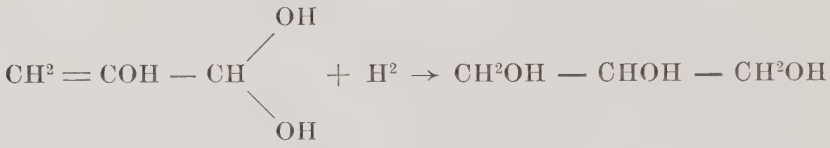
Acide pyruvique Forme cétonique Forme énolique
Aldéhyde pyruvique (Méthylglyoxal)



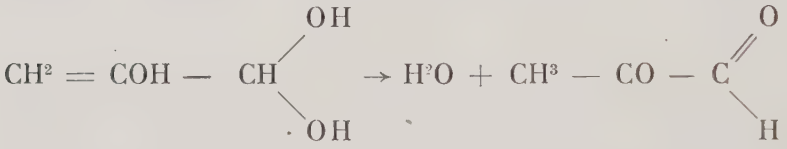
Hydrate d'aldéhyde pyruvique



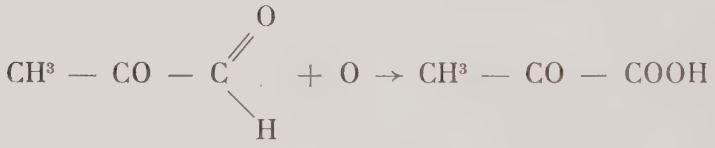
Une de ces deux molécules est immédiatement hydrogénée en glycérol.



L'autre molécule perd une molécule d'eau (on sait que les hydrates d'aldéhyde sont très instables) et se change en aldéhyde pyruvique de forme cétonique :



qui est oxydé et donne de l'acide pyruvique.



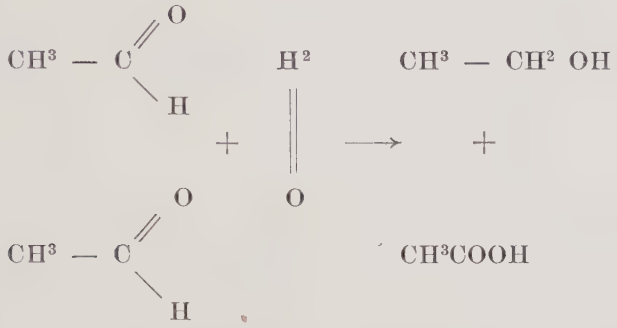
Il ne reste plus à la carboxylase qu'à changer l'acide pyruvique en aldéhyde acétique.

Remarquons que l'oxydation de l'aldéhyde pyruvique en acide et l'hydrogénation en glycérol sont deux réactions couplées qui se font, à partir des éléments de l'eau, par une réaction de dismutation ou de Cannizzaro.

Dans le troisième mode, en présence de carbonate de chaux, deux molécules de glucose se scindent en deux molécules de glycérol, deux molécules de gaz carbonique, une molécule d'acide acétique et une molécule d'alcool.

(3) $2\ C^6H^{12}O^6 \rightarrow 2\ CH^2OH - CHOH - CH^2OH + 2\ CO^2 + CH^3\ COOH + CH^3 - CH^2OH$

Ce type de fermentation n'est en somme que l'addition du type 1 et du type 2. Il se produit parce que la présence de carbonate de chaux amène le milieu en réaction à une alcalinité qui est optima pour l'aldéhydomutase. C'est pourquoi deux molécules d'aldéhyde acétique peuvent aisément se convertir en une molécule d'alcool et une molécule d'acide acétique :



Dans le quatrième mode de fermentation, une molécule de glucose donnera une molécule d'acide pyruvique et une molécule de glycérol.

(4) $C^6H^{12}O^6 \rightarrow CH^3 — CO — COOH + CH^2OH — CHOH — CH^2\ OH$

C'est en somme l'avortement du deuxième mode. Cela se comprend très bien lorsqu'on sait que ce quatrième type de fermentation ne se produit qu'en milieu acide (pH: 6,0 — pH 7,0) dans lequel la carboxylase n'agit pas.

Enfin le cinquième mode de fermentation aboutit essentiellement à l'obtention d'aldéhyde pyruvique :

(5) $C^6H^{12}O^6 \rightarrow 2\ H^2O + 2\ CH^3 — CO — C(=O)H$

En général, la fermentation ne s'arrête d'ailleurs pas à ce stade car il existe une diastase découverte par Dakin et Dudley en 1913, la cétoaldéhydomutase, qui est capable d'introduire une molécule d'eau dans l'aldéhyde pyruvique et de le transformer en acide lactique (Neuberg) :

$$CH^3 - CO - C(=O)H + H^2O \rightarrow CH^3 - CHOH - COOH$$

Aldéhyde pyruvique — Acide lactique

Le cinquième mode de fermentation explique en somme la fermentation lactique. Le schéma suivant, d'après NEUBERG, permet d'ailleurs de suivre les étapes de nos connaissances sur cette fermentation et d'en comprendre le mécanisme : "

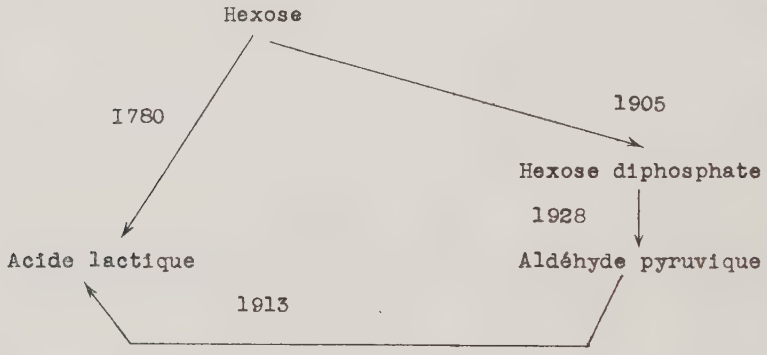
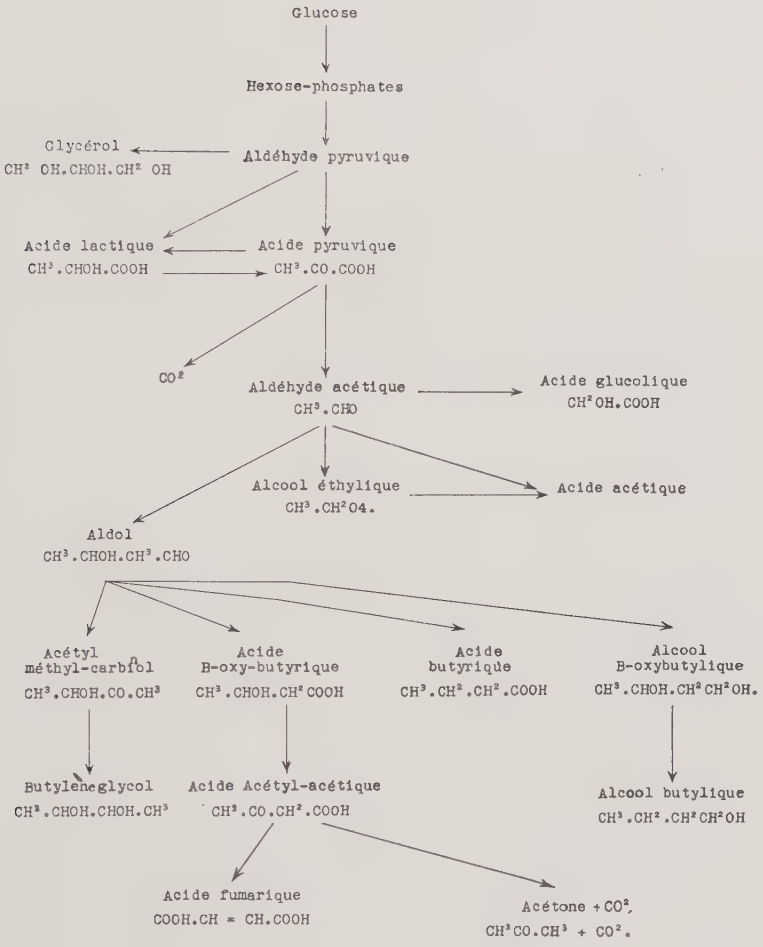
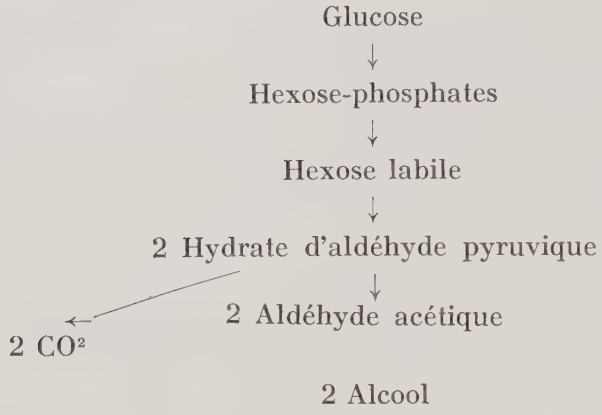


Schéma général des fermentations du Glucose et de quelques Hexoses voisins



Les études ainsi conduites nous éclairent sur les phases chimiques de la fermentation alcoolique vraie. Elles nous font comprendre aisément comment se forment l'alcool et le gaz carbonique. A l'heure actuelle, le schéma suivant rend compte des phénomènes connus :



Nous voyons donc que la fermentation alcoolique est un procédé biologique qui est soumis à un très grand nombre de facteurs accessoires pouvant intervenir au cours de l'action fermentative des microorganismes. Elle dépend d'un côté de la pureté et de la vitalité des cultures microbiennes employées et d'autre part d'une quantité d'éléments physiques et chimiques telle que la température à laquelle la fermentation s'effectue, des matières hydrocarbonées et protidiques se trouvant dans la solution mère et constituant l'alimentation essentielle pour les microbes, de la propreté et de l'hygiène existant dans les locaux et les récipients où la fabrication a lieu. En dernier lieu, mentionnons l'influence de la concentration en alcool ou en produit final résultant de l'action des agents diastasiques sur les matières fermentescibles.

Les principaux microorganismes intervenant dans la fermentation alcoolique sont des levures. Nous devons principalement à deux savants reconnaître le mérite d'avoir établi un peu de clarté dans ce grand groupe de champignons inférieurs. C'est à Hansen et à Guillermond qu'est dûe la classification que nous donnons ici. Ces auteurs distinguent d'après

les propriétés morphologiques et reproductrices différentes familles et genre de levure.

Les Saccharomycètes, qui renferment les principales espèces de levures industrielles telle que la levure de bière et la levure de vin par exemple.

Ce genre est caractérisé par la formation d'asques parthénogénétiques à une seule membrane germant par bourgeonnement, quelquefois on observe la formation d'un mycélium rudimentaire.

Guillermond distingue différents sous-groupes dans ce genre d'après les propriétés enzymatiques de ces levures :

1er sous-groupe. — Saccharomyces faisant fermenter les dextrose, maltose et saccharose, mais pas la lactose.

2e sous-groupe. — Saccharomyces faisant fermenter les dextrose et saccharose, mais ni la maltose ni la lactose.

3e sous-groupe. — Saccharomyces faisant fermenter les dextrose et maltose, mais ni la saccharose ni la lactose.

4e sous-groupe. — Saccharomyces faisant fermenter la dextrose, mais ni la maltose, ni la saccharose, ni la lactose.

5e sous-groupe. — Saccharomyces faisant fermenter la lactose.

6e sous-groupe. — Saccharomyces ne produisant pas de fermentation ou dont les caractères de fermentation sont insuffisamment connus.

Dans ce genre nous trouvons donc les Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces pastorianus, Saccharomyces ellipsoideus.

Le genre Zygosaccharomyces caractérisé par la présence d'asques se formant par copulation, d'ascospores à membrane lisse. Ici, il faut mentionner le Zygosaccharomyces japonicus et Zygosaccharomyces soya qui ont une importance industrielle.

Le genre Debaryomyces qui renferme des levures à asques dérivés de copulation; les ascospores sont globuleuses et pourvues d'une seule membrane veruqueuse.

Les genres Schwaniomyces et Torulaspora tous les deux caractérisés par la formation d'asques présentant des vestiges de copulation. Ces quatre derniers genres font partie d'un groupe différencié par Guillermond à la suite de leur propriété bourgeonnante et sexuelle.

Un autre groupe renferme le genre Schizosaccharomyces

qui se compose de levures se multipliant par cloisonnement et formant des asques par copulation à quatre ou huit ascospores pourvues d'une seule membrane. Dans ce genre nous mentionnons les Schizosaccharomyces Pombe produisant la bière de millet des nègres africains. Le Schizosaccharomyces octosporus qui est à la base de la fermentation des raisins de Corinthe et de Damas. Le Schizosaccharomyces mellacei, organisme très important pour la fabrication du Rhum de la Jamaïque et qui donne à cette boisson son goût spécial.

Nous n'insistons pas sur les levures telles que Pichia, Willia, Monospora, Nematospora qui ont été différenciés par Guillermond suivant leurs propriétés morphologiques et reproductrices dans un quatrième et cinquième groupe de la famille des Saccharomycétées.

La famille des Non-Saccharomycétées caractérisées par leurs cellules bourgeonnantes ne formant jamais des asques. Cette famille renferme les genres Torula, Mycoderma, Monilia et Cryptococcus de Guillermond.

Autres boissons alcooliques se rapprochant de la bière.

Nous avons antérieurement donné la définition et les propriétés essentielles de la bière due à l'action fermentative d'une levure, le Saccharomycès cerevisiae Nansen. Nous voudrions passer en revue ici une série de produits de consommation analogue à la bière que nous devons à l'action d'autres champignons inférieurs.

Le Kwass constitue la boisson nationale des Russes, c'est le produit de fermentation alcoolique de différentes sortes de farines, de malts, de grains avec addition de sucre ou de fruits. Finalement ces liquides alcooliques sont aromatisés au moyen de menthe ou d'autres plantes aromatiques. Le nombre de techniques pour la fabrication du Kwass est très grand, on le produit soit par une fabrication ménagère, soit industriellement dans quelques grandes villes de la Russie. Dans les casernes il existe des techniciens spéciaux qui préparent le Kwass d'après des données officielles. A Helsingfors, on opère d'après la formule de Henrici de la façon suivante. On prépare une émulsion pateuse au moyen de 2 kg. de malt et de la quantité d'eau nécessaire et on chauffe le tout à une chaleur douce. On introduit la pâte ensuite dans un tonneau et on y ajoute 18 litres d'eau bouillante. On laisse reposer le

tout pendant 24 heures, on décante avec précaution le liquide surnageant et on le réunit à 400 gr. de farine de froment, 800 gr. de sucre et 60 à 100 gr. de levure. La fermentation qui se produit à des températures assez élevées entre 25 et 30° est maintenue pendant 12 à 24 heures, puis on clarifie le liquide surnageant, on l'introduit dans des bouteilles qu'on ferme hermétiquement.

Le Kwass ainsi préparé renferme à peu près 0,5 à 2% d'alcool. 5 % d'extrait, 0,1 à 0,5 % d'acide lactique et 0,1 à 0,15% d'acides volatils. Les microorganismes qui interviennent dans la fermentation du Kwass sont des levures du genre Saccharomyces, des Torula et des bacilles lactiques. Il s'agit donc d'un liquide peu alcoolisé à goût fortement amer.

Le Bosa ou Busa est un liquide ressemblant beaucoup au Kwass qui est consommé principalement en Bulgarie, en Hongrie et en Yougoslavie ainsi que dans la Russie du Sud par la population musulmane. En Bulgarie on utilise pour sa préparation principalement le millet tandis qu'en Yougoslavie on fait plutôt appel au maïs. On cuit ces céréales pendant 8 à 12 heures en ajoutant des sons de froment et la quantité nécessaire d'eau; ensuite on triture la pâte obtenue en y ajoutant une petite quantité de levure à travers des tamis à mailles serrées. Finalement on incorpore du sucre ou du miel et on abandonne à la fermentation pendant un temps relativement court et à des températures de 25 à 30° pour obtenir finalement une boisson à goût complexe doux et amer à un degré alcoolique de 0,7 à 2%.

Le Braga est un liquide alcoolisé préparé en Roumanie et par des peuplades barbares au moyen de farine d'avoine de millet et de malt. On emploie aussi dans ce cas des levures du genre Saccharomyces et Torula et il s'agit d'une fermentation haute. La boisson légèrement alcoolisée ressemble beaucoup au Bosa.

La bière des nègres qui est préparée en Afrique est obtenue en partant de différentes céréales des genres Sorghum, Penicillaria et Eleusine. On fait germer ces différentes graines, on sèche dans le soleil et on triture fortement pour pulvériser le tout. On mélange la poudre obtenue avec de l'eau, on chauffe à ébullition et on abandonne à la fermentation spontanée. Les agents diastasiques de la bière de nègre sont principalement formés par des levures et des

bactéries lactiques. Ces germes sont déjà véhiculés par les graines de céréales employées ou bien ils cultivent sur les parois des récipients utilisés pour la fabrication. On y trouve principalement des Saccharomycétées et le principal ferment alcoolique est produit par le Schizosaccharomyces Pombe. Les nègres absorbent habituellement le liquide encore en fermentation quelques jours après la préparation sans le séparer du dépôt plus ou moins précipité. Une analyse de cette boisson effectuée par Saare a donné les résultats suivants 2,4 % d'alcool, 1,4 % de sucre, 0,5 % d'acide exprimé en acide lactique. Ces bières de l'Afrique sont très probablement des dérivés des bières fabriquées pendant l'antiquité par les Egyptiens au moyen d'extrait de malt additionné de safran et d'autres épices. Cette boisson portait le nom de Xythos.

Le Ginger-beer (bière de Gingembre) préparé principalement en Angleterre à l'aide de solutions de Saccharose de 10 à 20% additionnées de quelques morceaux de Gingembre, est dû à l'action symbiotique d'une levure Saccharomyces piriformis et d'une bactérie Bacillus vermiforme vivant sur les croûtes de la plante appelée Ginger-beer Plant. Ces agents occasionnent une fermentation vive des solutions sucrées dont il résulte une production peu abondante d'alcool et d'acide acétique et principalement de l'acide carbonique et de l'acide lactique.

Au Mexique, on boit une bière appelée Tibi résultant de la fermentation d'une solution sucrée, par 2 microorganismes associés : Pichia radaisii et Bacillus mexicanus. Ces organismes vivent principalement sur des plantes du genre Opuntia et figuier de barbarie. Ces études ont été effectuées par Lutz qui a pu caractériser les agents de la fermentation. Les solutions sucrées sont très vites transformées par l'incorporation des graines de Tibi en une boisson mousseuse à goût légèrement amer et à degré alcoolique assez faible. Krœmer croit que les graines vivantes utilisées par Bapst à Paris pour fabriquer une boisson peu alcoolisée sont formées par les mêmes microorganismes que ceux isolés par Lutz du Tibi.

Le Saké est la boisson nationale des Japonais, il est obtenu par saccharification et fermentation du riz au moyen de l'Aspergillus orizae Ahlb. Il s'agit d'une sorte de vin de riz qui a été déjà mentionné il y a deux millè ans par les

historiens japonais et qui est industriellement préparé au Japon depuis environ 200 ans. Nous nous permettons de mentionner ici que le bénéfice touché par l'Etat japonais annuellement en impôts sur la fabrication de Saké se monte environ à 100 millions de francs-or. Au point de vue scientifique il faut retenir que l'amidon du riz utilisé comme matière première ne provient pas de la germination de graines de riz mais leur saccharification est dûe à l'action directe de l'Aspergillus orizae. La fabrication se fait d'après la technique suivante : le riz est étalé en couches minces dans des chambres chaudes (20 à 25°). L'Aspergillus est directement ensemencé sur le riz et porte le nom populaire de Tane-Koji. On couvre ensuite les couches de riz au moyen de pailles et il s'y développe dans quelques jours sur chaque graine un mycélium filamenteux. La réaction passe par une forte augmentation de la température qui monte malgré les brassages journaliers au-dessus de 40°. Le Koji, produit saccharifié du riz renferme une grande quantité de diastase dûe à l'Aspergillus orizae mais on y trouve naturellement encore une grande quantité de germes accessoires : des moisissures, des levures et des bactéries.

Le Koji renferme à peu près 10% de sucre en plus que le riz dont on est parti. Au moyen de ce produit on prépare dans les brasseries de Saké une sorte de levure appelée le Moto. Cette préparation se fait de la façon suivante : on mélange le Koji avec de l'eau et du riz cuit et on expose à la fermentation à une température basse ne dépassant pas + 10°. On obtient après quelques jours une liquéfaction de la totalité de la masse se trouvant en état de fermentation très marqué. On monte lentement la température à 20° et plus tard on opère entre 30 à 35°. Au bout de 18 jours à peu près le Moto est terminé et on obtient un liquide très riche en levure qui renferme à côté du sucre non fermenté 0,5 à 0,8% d'acide libre formés principalement par l'acide lactique et 3 à 14% d'alcool.

Ce produit est ensuite utilisé pour la fabrication du Saké même. Pour cela on mélange du riz cuit avec du Koji et du Moto dans de grands récipients avec addition d'eau. La saccharification et la fermentation s'effectue à des températures relativement basses entre 10 et 15°; à la suite de la

fermentation on assiste plus tard à une augmentation spontanée de la température qui monte jusqu'à 20°. Après des additions successives de Koji et de riz à la masse initialement mise en œuvre la fermentation s'arrête spontanément après 2 ou 3 semaines. Le liquide ainsi obtenu est décanté, clarifié et souvent même pasteurisé. On abandonne le Saké frais au repos dans des grands tonneaux pendant plusieurs mois et la boisson vendue à la consommation prend une teinte jaune vineuse à goût rappelant le Cherry. Ce liquide est assez alcoolisé et contient jusqu'à 18% d'alcool, une analyse effectuée par Kozai d'un Saké préparé au moyen de cultures pures d'Aspergillus orizae et de Saccharomyces Saké a donné les résultats suivants : Densité 0,994, alcool 13,40 gr., extrait sec 3,62 gr., acides non volatils 0,07 gr. exprimés en acide lactique, acides volatils 0,03 gr., glucose 0,5 gr., dextrine 0,55 gr., cendre 0,05 gr. pour 100 cc. de substance.

Il faut donc retenir pour la préparation du Saké que nous avons à faire avec deux procédés tout différents dûs à l'intervention de deux germes : La saccharification du riz est réalisée par l'Aspergillus orizae qui produit principalement du maltose et du glucose. La fermentation alcoolique est ensuite réalisée par des levures et principalement par le Saccharomyces Saké.

Nous mentionnerons encore la bière chinoise Angh-Khak due à l'action fermentative du Monascus purpureus.W. Le travail de saccharification effectué dans la préparation du Saké par l'Aspergillus orizae est ici confiée à une association d'autres cryptogames inférieurs de la famille des Oomycetes et principalement à des espèces de Mucor et de Rhizopus. Le liquide alcoolique obtenu est à peu près analogue à celui du Saké.

Pour compléter l'énumération de ces différentes boissons à caractères sensiblement analogues à la bière nous voudrions encore citer le Yarak préparé dans l'Amérique du Sud au moyen de racines de Manihot et le Kawa fabriqué en Australie à l'aide de la racine de Piper Methysticum Forst mélangé avec de la salive, de l'eau et du lait de coco. Ici nous n'avons cependant pas uniquement à faire avec un produit alcoolique mais avec une boisson renfermant en outre des alcaloïdes du Kawa ayant une action analogue à la cocaïne.

Mentionnons en plus la sauce Soya employée au Japon et dûe à l'action fermentative de l'Aspergillus orizae sur des masses pâteuses d'haricots (Soya). Après la saccharification de matières amylacées du Soya, Saito a pu démontrer l'intervention de deux bactéries : Bacterium Hamaguchiae et Bacterium Soya qui produisent principalement une fermentation lactique accasionnant la maturation et l'aromatisation de la sauce. Il faut encore incorporer à celle-ci un pourcentage de chlorure de sodium (15 à 17 %) très élevé pour empêcher la production d'une fermentation des matières albuminoïdes incorporées dans la sauce.

Nous croyons ainsi avoir apporté une contribution historique assez étendue pour prouver l'importance des microorganismes dans la fabrication des boissons alcoolisées dans le genre de la bière et l'utilité de l'étude et de l'isolement à l'état de pureté de ces germes pour obtenir une fermentation alcoolique stricte, évitant la formation de sous-produits accidentels occasionnant une diminution de la valeur commerciale de ces produits.

Vins secs et vins de liqueur

Le vin est la boisson résultant de la fermentation plus ou moins complète du jus de raisin ou moût, obtenu par pression du fruit parvenu à maturité. Ce résidu porte le nom de marc.

A. — Généralités.

La fermentation est due à la présence de levures diverses dont la principale est le Saccharomyces ellipsoideus ; elle provoque la transformation en alcool et gaz carbonique des sucres contenus dans le moût (glucose en particulier), d'après la formule suivante :

$$\underset{180}{C^6H^{12}O^6} = \underset{46 \times 2}{2\ C^2H^5OH} + \underset{44 \times 2}{2\ CO^2}$$

On estime, dans les calculs courants, que les sucres fournissent environ la moitié de leur poids d'alcool.

La formation de l'anhydride carbonique est mise en évidence par la présence d'un grand nombre de bulles ; on dit alors que le vin boût.

La fermentation du jus de raisin blanc se fait directement

et donne le vin blanc; dans les mêmes conditions le moût de raisin rouge fournit un liquide peu coloré désigné sous le nom de vin gris; quand au contraire il est mis à fermenter sur le marc, on obtient le vin rouge. Le raisin peut être avant la pression égrapé ou non; dans le dernier cas le vin est plus riche en tanin et partant plus rude.

En ce qui concerne la classification des divers vins nous nous en remettons aux données de Leprince et Lecoq. Les vins secs ordinaires de beaucoup les plus abondants dont la consommation est extrêmement répandue en France, comprennent : les vins blancs, les vins gris ou rosés et les vins rouges qui se différencient les uns des autres non seulement par leur mode de préparation comme nous l'avons déjà dit, mais encore par leur composition et surtout par rapport à l'extrait et au sucre réducteur.

Les vins de sucres appelés aussi vins de deuxième cuvée ou vin de marc, sont des produits de qualités inférieure que l'on obtient en faisant fermenter les marcs, entièrement pressurés ou non en présence d'un mélange d'eau et de sucre. Ces vins contiennent d'habitude soit du Saccharose resté inattaqué soit de la dextrine provenant des glucoses impurs.

Les piquettes résultent de la simple action de l'eau sur le marc de raisin sans addition du sucre. On ne peut employer légalement ces vins que pour la consommation familiale.

Les vins de raisins secs se préparent en restituant aux raisins secs, dans des conditions spéciales l'eau qu'ils ont perdus pendant la dessiccation. On introduit dans une cuve 100 kg. de raisins secs et 100 à 150 litres d'eau portée a une température variant entre + 30 et + 70°; après 2 à 3 jours on constate que le raisin est gonflé. Il est alors écrasé et pressé. Le liquide soutiré est abandonné à la fermentation alcoolique qui a lieu comme pour les vins ordinaires. Aucun réglement ne fixe la quantité d'eau à employer pour un poids donné de raisin.

Les vins de liqueur sont des vins suralcoolisés, qui peuvent être obtenus de deux manières différentes :

1° Addition préalable de sucre au moût qui est abandonné à la fermentation jusqu'à ce que la quantité d'alcool produite arrête d'elle-même l'action des levures.

2° Addition d'alcool dans un moût ordinaire, alors que la fermentation est déjà plus ou moins avancée.

Dans cette catégorie, rentrent les vins de Banyuls, Muscat, Porto, Xérès, Madère, Marsala, etc...

Les mistelles proviennent de l'expression de raisins frais mais on empêche aussitôt la fermentation par addition d'alcool ou d'acide sulfureux. Cette opération s'appelle le mutage. Les mistelles contiennent donc la totalité du sucre provenant des raisins et de l'alcool surajoué. Les vins de liqueurs au contraire renferment de l'alcool de fermentation et tous les produits secondaires notamment de la glycérine et de l'acide succinique. Il n'y a dans les mistelles qu'une très petite quantité de bitartrate de potasse.

Les vins mousseux sont préparés soit par le procédé champenois dans lequel la gazéification résulte d'une série de traitement et de manipulations spéciaux (addition de sucre et d'alcool au moment de la mise en bouteilles), soit par addition de gaz carbonique pur.

Les vermouths sont des vins naturels ou alcoolisés additionnés d'infusions alcooliques de plantes aromatiques : (absinthe, marjolaine, coriandre, cannelle, muscade, sauge, serpolet, écorce d'orange amère) ou de macérations de ces mêmes plantes pulvérisées. C'est à ces manipulations diverses qu'ils doivent leurs saveurs particulières.

La composition des vins varie avec différents facteurs : nature du cépage, climat, constitution du sol, degré de maturité du fruit, soins donnés à la fabrication, etc...

Ce sont des liquides plus ou moins alcooliques contenant à côté de l'eau (80 à 90%) et de l'alcool éthylique (5 à 15%) de petites quantités des éléments suivants : composés à fonction alcoolique, des aldéhydes, des sucres et des hydrates de carbone, des acides libres et combinés, du tanin, différentes bases minérales et des matières colorantes.

L'importance de l'action des levures et des microorganismes en général pour la production des vins est très grande. Ici intervient un facteur primordial : la suppression d'une infection secondaire des moûts de raisins par des bactéries, qui occasionnent la production de produits secondaires, donnant au vin une acidité trop prononcée ou un goût désagréable. Pour ces raisons on a commencé aussi dans les

établissements viticoles à ensemencer les moûts directement au moyen de levures de souche et de qualité connues, isolées préalablement en cultures pures.

Les petits producteurs de vin s'aident simplement en fabriquant les vins dans des tonneaux plus réduits, bien fermés et protégés contre l'envahissement des germes venant de l'extérieur.

Une fois la fermentation alcoolique des moûts des raisins terminée on assiste à une seconde fermention: la fermentation acide, moins importants pour les vins rouges que pour les vins blancs et surtout pour les vins d'Alsace et d'Allemagne. Ce processus intéresse surtout l'acide malique qui se trouve dans le vin trop jeune. Les microorganismes qui interviennent dans ce phénomène sont principalement des Micrococcus : M. malolacticus, M. acidovorax, M. variococcus et Bacterium gracile. Ces êtres décomposent l'acide malique en acide lactique et en anhydride carbonique. L'acidité des vins est ainsi diminuée et le parfum, la fleur des vins est sensiblement amélioré.

La culture pure de ces organismes n'a pas encore été réalisée pratiquement dans l'industrie jusqu'à présent; pour cette raison les viticulteurs sont encore toujours obligés d'avoir recours à la production spontanée de cette fermentation. Différents facteurs favorisent le commencement de ce phénomène : Tenir les caves à une certaine température pas inférieure à + 12°; agiter et mélanger le vin après la fermentation alcoolique pour réémulsionner les couches de levures, prudence au moment du sulfitage des tonneaux.

Nous voyons donc par la description générale que nous venons de donner pour la préparation des vins l'importance des microorganismes qui interviennent soit dans la fermentation alcoolique, soit dans la fermentation acide, et nous croyons avoir donné dans notre exposé un aperçu général sur la fermentation alcoolique et les différents produits de consommation en résultant. Cette fermentation due uniquement à l'intervention de microorganismes que nous connaissons actuellement plus ou moins prouve l'importance de ces êtres pour l'économie humaine en général.

CHAPITRE II.

La fermentation cellulosique

Nous n'avons pas l'intention d'entrer dans les détails de la fermentation cellulosique dûe à des microorganismes. L'historique de ces procédés enzymatiques a été décrit en détail dans les travaux de Khouvine-Delaunay et de R. Sartory. Nous allons donc donner un résumé très succinct de cette fermentation.

La base des résidus végétaux est constituée comme on le sait de cellulose. Partout où nous trouvons des grandes quantités de dépôt de végétaux, dans la terre, dans les marais, dans les fumiers, dans le tube digestif des animaux végétariens on peut constater une fermentation cellulosique très énergique. Si on remue par exemple la vase d'un étang on constate immédiatement un dégagement de gaz (le méthane) qui est une première preuve qu'il s'agit de processus enzymatiques et principalement de la fermentation cellulosique qui s'effectue en profondeur.

Pour étudier la fermentation cellulosique, Omeliansky a inoculé le milieu suivant qui a été introduit dans des ballons au moyen de vase ou de fumier. Le substrat a été constitué de petits morceaux de papier filtre, de 1 gr. de phosphate d'ammonium, 1 gr. de phosphate de potassium, 0,5 gr. de sulfate de magnésium, des traces de chlorure de sodium et le tout a été dissous dans un litre d'eau distillée. A ce milieu d'Omeliansky, il faut ajouter quelques fractions de craie. La fermentation se produit au bout de 1 à 2 semaines à la température de 35° et on constate une acidification très prononcée du milieu et un dégagement gazeux (CO^2 et H^2 ou CO^2 et CH^4). La solution initialement limpide devient trouble à ce moment et le papier filtre introduit dans le milieu commence à devenir mou et prend une teinte jaunâtre dans la profondeur du milieu, tandis que les feuilles qui nagent à la surface prennent

une consistance mucilagineuse et se décomposent de plus en plus par l'action des microorganismes pour se dilacérer finalement. On peut également constater la présence de feuilles de papier filtre qui portent par endroits de petits trous comme si ces feuilles avaient été percées par des petits vers. Au moyen de repiquages successifs, Omeliansky a pu obtenir un enrichissement très notable de l'agent microbien de la décomposition cellulosique. Il a ainsi pu isoler un bacille assez long grêle souvent légèrement incurvé, muni très souvent à l'une des extrémités d'une spore ronde de diamètre plus grand que le bâtonnet même.

Par la suite on a pu faire les constatations suivantes, si on effectue la culture dans les conditions ci-dessus indiquées sans chauffage préalable on aboutit presque régulièrement à une production de méthane, et d'anhydride carbonique. Si on procède par contre préalablement à une pasteurisation du milieu, c'est-à-dire si on chauffe celui-ci environ 15 minutes à 75°, on constate l'apparition d'une fermentation hydrogénée de la cellulose avec les produits terminaux : hydrogène, anhydride carbonique, acides gras simples jusqu'à l'acide butyrique.

Les agents de ces deux processus de la fermentation cellulosique se ressemblent morphologiquement d'une façon assez prononcée, ils se différencient cependant par leurs dimensions. Le bacille de la fermentation hydrogénée a été appelé Bacillus cellulosae hydrogenicus, il est à peu près 1 1/2 fois plus grand que le bacille de la fermentation méthanique qui porte le nom de : Bacillus cellulosae methanicus. Le premier mesure environ 0,5μ de longueur, le deuxième a environ 0,3μ, les spores du bacille de la fermentation hydrogénée ont 1,5μ de diamètre, tandis que celles de la 2e bactérie mesurent environ 1 μ. Les deux bactéries sont Gram-négatif et elles sont dépourvues de granulations, ce qui les différencie nettement du Bacillus amylobacter, qui a été antérieurement considéré par mégarde comme l'agent de la fermentation cellulosique.

Les deux microorganismes ainsi isolés par Omeliansky doivent être classés dans le groupe des Bacilles butyriques, puisqu'ils occasionnent une fermentation cellulosique anaérobie suivant le type de la fermentation butyrique. Ce pro-

cessus de dégradation est la suite d'une secrétion enzymatique de ces organismes que l'on désigne sous le nom de Cellulase. Il s'agit donc d'un enzyme de saccharification de la cellulose.

Les sucres qui résultent de cette dégradation sont ensuite dégradés suivant les processus de la fermentation butyrique et on peut donc déceler dans les milieux la formation d'acide butyrique, d'acide acétique, d'anhydride carbonique et de méthane d'un côté ou d'anhydride carbonique et d'hydrogène de l'autre. Les deux fermentations donnent lieu à un dégagement de chaleur qui est à peu près analogue à celui de la fermentation alcoolique.

Cette fermentation de la cellulose évolue à peu près avec la même intensité dans les expériences de laboratoires que dans la nature.

Un grand pas en avant dans l'étude de la dégradation de la cellulose dans la nature a été marquée par les travaux de Van Iterson. D'après cet auteur, la destruction de la cellulose dans le sol peut se faire d'après quatre processus différents.

1) Le processus en anaérobie qu'il divise en deux parties:

a) En l'absence de nitrate de potasse, par les bactéries de la fermentation méthanique et hydrogénée.

b) En présence de nitrate par les bactéries dénitrifiantes d'après la formule :

$$5\ C^6H^{10}O^5 + 24\ NO^3K = 24\ CO^3KH + 12\ N^2 + 6\ CO^2 + 13\ H^2O$$

$$C^6H^{10}O^5 + 8\ NO^2K = 4\ CO^3H\ K + 2\ CO^3K^2 + 4\ N^2 + 3\ H^2O$$

Cette réaction s'effectue toujours en l'absence de l'air ou dans une atmosphère pauvre en oxygène malgré le caractère aérobique des bactéries qui en sont la cause.

2. Le processus en aérobie que l'auteur divise aussi en deux parties :

a) Si le milieu dans lequel la cellulose se trouve est alcalin, l'action dégradatrice revient à des bactéries principalement.

b) Si le milieu est acide c'est à des champignons inférieurs ou à des mycéliums de champignons supérieurs.

Cet auteur a ainsi pu isoler une bactérie cellulophage en aérobie auquel il a donné le nom de Bacillus ferrugineus. Ce germe vit généralement en symbiose avec des Micrococcus secrétant en pigment jaune.

Les travaux sur les bactéries aérobies cellulophages ont

été poursuivis par Rossi, Grazia de Capraris qui a pu isoler le Bacillus comesii, lequel décompose la cellulose en présence de nitrates et le Bacillus vulgatus qui agit sans nitrates. Beijerink et Minkmann ont obtenu en employant aussi des boues vaseuses une décomposition cellulosique par des bactéries dénitrifiantes. Ils ont ainsi isolé le Bacillus nitrogenes ; en poursuivant leurs travaux ils ont pu démontrer que le Clostridium americanum et l'Azotobacter sont incapables en cultures pures d'attaquer la cellulose. Beijerink a trouvé en symbiose avec ces organismes le Bacillus radiobacter qui attaque fortement la cellulose en produisant comme terme final de l'hydrogène.

Nous mentionnons enfin les travaux très importants de Pringsheim qui, en expérimentant les différents processus d'hydrolyse de la cellulose, a réussi à mettre en évidence les produits intermédiaires, c'est-à-dire des di- et monosaccharides résultant de l'action des endoferments produits par ces différentes catégories de bactéries.

En rapport immédiat avec la dégradation cellulosique dans la nature, il faut mentionner le processus de l'humification des débris organiques parce que les sols riches en humus sont caractérisés par leur fertilité excessivement prononcée. Cette humification est le résultat des réactions d'oxydation de produits organiques qui s'effectuent en aérobie par l'action de bactéries et de moisissures. D'après Beijerink, le Streptothrix chromogena, une bactérie qui a un pouvoir d'oxydation très prononcé joue un rôle prépondérant dans cette humification des matières organiques. Mais ces réactions sont encore peu étudiées au point de vue bactériologique.

La carbonisation des débris organiques, c'est-à-dire la décomposition de ceux-ci dans des combinaisons riches en carbone a sûrement eu lieu dans les périodes géologiques lointaines sous l'influence des microbes. On peut admettre que la cellulose des végétaux a été décomposée par la fermentation bactérienne avec formation de carbone, d'anhydride carbonique et de méthane d'après la formule globale suivante :

$$2\ C^6H^{10}O^5 = 2\ C + 5\ CO^2 + 5\ CH^4$$

Pour compléter notre historique sur la fermentation cellulosique, nous mentionnons encore les microbes de la fermentation intestinale. Nous savons que les glandes digestives de

l'homme, par exemple, ne secrètent pas de diastases capables d'hydrolyser la cellulose. La cellulose résiste à toutes les diastases élaborées par le tube digestif de l'homme. Nous en serions réduits à utiliser la cellulose uniquement comme aliment de lest, si certains microbes qui possèdent dans leur protoplasme une diastase, une cytase, qui va digérer certaines celluloses, les hémicelluloses, n'opéraient la digestion de ces hydrates de carbone et ne nous permettaient d'utiliser les produits de cette digestion.

Les travaux d'Ellenberger et Hofmeister, de Tappeiner, de Rubner, de Khouvine-Delauney, de René Sartory, ont démontré l'importance des microorganismes bactériens et fungiques pour la dégradation de la cellulose, soit chez les carnivores, soit chez les herbivores.

Le rôle utile de la fermentation cellulosique dans l'industrie a été prouvé par la méthode de Volcker qui a permis la production de l'amidon au moyen de pommes de terre. Les membranes cellulosiques des cellules de la pomme de terre sont lysées au cours de cette technique par des bactéries qu'on ensemence sur les pommes de terre. La même fermentation a une valeur essentielle dans la production du foin. Dans les dernières années, on a utilisé les découvertes bactériologiques dans ce domaine de la fermentation cellulosique pour l'épuration et la destruction des matières organiques dans les égouts et les eaux d'évacuation des villes par la construction des bassins de putréfaction (Septic-Tanks) que l'on ensemence avec les microorganismes de la fermentation cellulosique.

Nous avons donc ainsi cru pouvoir démontrer l'importance pour la vie animale et végétale de l'existence de ces microbes agents de la fermentation cellulosique.

CHAPITRE III

La fermentation acétique

Dans un chapitre antérieur, nous avons pu démontrer par le schéma des fermentations des Hexoses de Cristol que lors de ces réactions on aboutit généralement à la formation d'acide organique: acide acétique, acide butyrique, acide lactique, etc... Dans certains cas, ces acides apparaissent seulement en très petites quantités et sont le résultat de réactions secondaires. Par contre, dans d'autres réactions, ces acides se forment comme produit final et quantitativement prépondérant.

Nous classons dans la catégorie de processus fermentatifs de ce genre la fermentation acétique butyrique et lactique et quelques autres réactions moins répandues, la fermentation oxalique et citrique. Ces genres de fermentation se différencient d'après leurs caractères de base d'une façon très prononcée. Les fermentations acétique, oxalique et citrique doivent être classées dans le groupe des réactions d'oxydation qui s'effectuent seulement en présence de grandes quantités d'air, la fermentation butyrique par contre peut servir d'exemple typique d'un processus de fermentation strictement anaérobique qui s'effectue par conséquent seulement en l'absence de toutes traces d'oxygène libre. Un groupe intermédiaire entre ces deux catégories est formé par la fermentation lactique qui peut se pratiquer soit en aérobie, soit en anaérobie. Nous allons envisager successivement ces différentes catégories de fermentation.

Parmi les fermentations aérobies provoquées par des bactéries, la fermentation acétique est celle qui par son importance pratique et par de nombreuses et célèbres études mérite d'être mentionnée à titre d'exemple. La transformation de l'alcool éthylique en acide acétique a été pour la première fois étudiée par Pasteur en 1864. Il a repris, avec toute la

précision de la méthode expérimentale, l'étude de la fabrication du vinaigre, puis a montré qu'il s'agissait d'un processus microbien.

La fabrication du vinaigre

Le vinaigre connu sans doute aussi anciennement que le vin, c'est-à-dire depuis la plus lointaine antiquité, a été, de tout temps recherché comme condiment, sa fabrication, se perfectionnant peu à peu, par des notions purement empiriques, s'était finalement fixée, avant Pasteur, à deux procédés qui, généralement, réussissaient, mais non sans aléas.

Dans la méthode d'Orléans, de grands tonneaux, couchés horizontalement, étaient remplis, jusqu'au quart de leur contenu, d'un mélange de vin et de vinaigre, on complétait, peu à peu, avec du vin ; l'ensemble, ainsi préparé, s'acidifiait, on soutirait peu à peu le vinaigre formé et ajoutait, en même temps, de nouvelles quantités de vin ; l'intérieur du tonneau était constamment aéré par une ouverture jamais close et, à la surface du liquide en voie de transformation, se développait, peu à peu, un voile membraneux, d'abord mince, qui s'épaississait à la longue : la mère du vinaigre.

Dans la méthode allemande, on arrose des copeaux de bois de hêtre, contenus dans un tonneau, d'un liquide alcoolique additionné de quelques millièmes d'acide acétique; on recueille le produit qui s'écoule au fond du tonneau ; celui-ci est traversé de bas en haut par un courant d'air qu'entretiennent des ouvertures convenablement disposées.

Avant les recherches de Pasteur, on admettait généralement que l'oxydation de l'alcool en acide acétique était provoquée par l'action de corps poreux (le voile superficiel ou mère du vinaigre dans le procédé d'Orléans, les copeaux dans la méthode allemande) en présence de l'oxygène de l'air.

Le rôle nécessaire des microbes dans la fermentation acétique

Pasteur démontra que le voile flottant à la surface du liquide en voie d'acétification, dans le procédé d'Orléans, est constitué par les innombrables cellules d'une bactérie, dont il décrivit les caractères.

Ce microbe est l'agent nécessaire de la fermentation ; en son absence, un liquide alcoolique ne s'acétifie en aucun cas ; il suffit d'ajouter à un milieu alcoolique une trace insigni-

fiante du voile microbien pour déterminer, à sa surface, la formation d'un nouveau voile et pour provoquer, en même temps son acétification. Dans le procédé allemand, le microorganisme pullule à la surface des copeaux et peut y être décelé. L'ensemencement est réalisé, dans les celliers où l'on fabrique le vinaigre, par une mouche spéciale (Drosophila cellaris ou Mouche du vinaigre) : celle-ci vit sur les liquides vinaigrés et dissémine les bactéries acétifiantes dont elle porte des germes sur ses pattes.

Le pouvoir fermentaire du microbe. — Il est considérable. Si l'on dépose une trace infinitésimale du microorganisme sur une surface de un mètre carré d'un liquide alcoolisé, celle-ci sera couverte, en vingt-quatre heures et à 20°, d'un voile microbien continu, pesant 0 g. 50 environ, à l'état sec (Duclaux) ; en admettant que ce voile soit formé d'une seule couche de cellules, on calcule connaissant les dimensions de celles-ci, qu'elles seraient au nombre de 300 milliards.

La quantité de substance transformée au cours de ce développement si rapide est relativement formidable et sans aucun rapport avec le poids de substance sèche résultant de la prolifération microbienne : on a calculé que celui-ci peut acétifier, en vingt-quatre heures, 2.000 fois son propre poids d'alcool

Dans le schéma des fermentations hydrocarbonées que nous avons antérieurement donné, on peut se rendre compte que la fermentation acétique provient également de l'oxydation de l'acétaldéhyde. La réaction est généralement couplée avec une réaction d'hydrogénation donnant l'alcool éthylique. Nous avons donc à faire au troisième mode de réaction enzymatique de Neuberg. L'acide acétique provient également de l'oxydation de l'alcool éthylique dans la fermentation acétique ordinaire par le Mycoderma aceti.

Les bactéries acétiques exigent donc une grande quantité d'oxygène, ce que Duclaux avait déjà démontré en prouvant qu'en trente-six heures ces microbes consomment jusqu'à 500 fois leur poids d'oxygène. On peut exprimer la réaction par l'équation globale suivante :

$$CH^3CH^2OH + 2\,O = CH^3COOH + H^2O.$$

Des recherches effectuées par Hansen, Duclaux, Henne-

BERG et d'autres, il ressort que les bactéries acétifiantes sont très nombreuses et très difficilement classables. De nombreuses espèces ont été étudiées telles que le Bacterium aceti, le Bacterium Pasteurianum, le Bacillus oxydans, le B. xylinum, le B. acetosum, le B. vini acetati, le B. aceti vini, etc... Tous se présentent sensiblement sous forme de petites cellules plus ou moins cylindriques disposées en chaînettes facilement dissociables. Ces diverses espèces peuvent surtout être différenciées par les caractères du voile qu'elles forment à la surface des milieux de culture, prenant un aspect sec ou muqueux, lisse ou ridé, etc... Ils se distinguent d'autre part, par différentes propriétés biochimiques secondaires et physiologiques.

Entre ces différentes bactéries, il en est, par exemple, qui s'attaquent même directement à l'acide acétique si l'alcool commence à manquer dans le milieu ; il apparaît que l'acide acétique est alors complètement oxydé de son côté comme un banal aliment respiratoire.

CHAPITRE IV

La fermentation butyrique

Dans le schéma de la fermentation hydrocarbonée antérieurement donné, nous avons fait ressortir que le stade d'aldéhyde acétique forme une sorte de plaque tournante d'où partent les différentes formes de fermentations. En effet, l'aldéhyde acétique peut se polymériser d'après le phénomène de l'aldolisation de Wurtz pour donner une molécule d'alcool :

$$CH^3\ COH + CH^3\ COH = CH^2\ CHOHCH^2COH.$$

A partir de ce corps peuvent se faire de nombreuses fermentations anaboliques, que nous avons indiqué dans le schéma même. Nous pouvons y voir qu'une des formes ainsi réalisables est la fermentation butyrique, que l'on peut envisager comme un réarrangement moléculaire de l'aldol d'après les équations suivantes :

$$CH^3CHOHCH^2C\begin{matrix}O\\ \diagdown\\ H\end{matrix} \rightarrow CH^3CH^2CH^2COH$$

La production d'acide butyrique est intéressante du point de vue biologique parce que l'on voit apparaître ici le premier acide gras à partir des glucides. Il se formerait ainsi chez les êtres vivants des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone à partir de l'aldéhyde acétique, tandis que la formation des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone s'explique par l'union d'une molécule d'aldéhyde pyruvique à une molécule d'aldéhyde acétique.

Les bactéries qui provoquent des fermentations butyriques sont extrêmement nombreuses, mais elles se caractérisent essentiellement puisqu'elles sont toutes rigoureusement

anaérobies. Nous pouvons donc considérer la fermentation butyrique comme exemple d'une fermentation anaérobie. Comme bactéries butyriques, nous ne citerons que quelques espèces : le vibrion butyrique qui attaque l'acide lactique avec formation d'acide butyrique, de gaz carbonique et d'hydrogène suivant la formule globale :

$$2C^3H^6O^3 = C^3H^7COOH + 2CO^2 + 2H^2.$$

Mitscherlich, Trecul et Van Tieghem ont étudié et caractérisé un autre ferment butyrique, le Bacillus amylobacter vivant normalement dans le sol. Il attaque de nombreux glucides: glucose, saccharose, composés pectiques, hydro-celluloses, etc... Il décompose ces matières avec formation d'acide butyrique et dégagement d'hydrogène et de gaz carbonique, d'après l'équation suivante :

$$C^6H^{12}O^6 = C^3H^7COOH + 2CO^2 + 2H^2.$$

Un autre exemple est le Bacillus amylozyme, qui attaque rapidement l'amidon et forme à ses dépens de l'acide butyrique, de l'acide acétque, de l'alcool amylique, de l'alcool éthylique, du gaz carbonique et de l'hydrogène.

Guillermond et Mangenot mentionnent en outre le Bacillus orthobutylicus qui agit sur le glucose, le saccharose, l'amidon, l'inuline, mais respecte les celluloses et produit de l'acide butyrique, de l'alcool butylique, du gaz carbonique et de l'hydrogène.

Ces divers exemples pourraient être multipliés ; le Bacillus perfringens, l'un des agents de la gangrène gazeuse, est un ferment butyrique ; certains anaérobies fixateurs d'azote libre, tels que Clostridium Pasteurianum, le sont également ; mentionnons encore le Bacillus paraputrificus, le B. bifidus, le B. putrificus. Le rôle que jouent dans la nature ces êtres si répandus, est donc d'une importance fondamentale.

Les bactéries butyriques sont parmi les agents de décomposition, les plus actifs des organismes végétaux ; ces derniers sont en effet, riches en glucides, attaquables par l'un ou l'autre de ces microbes. Ceux-ci se développent donc activement dans les cadavres de végétaux supérieurs, maintenus immergés ou humides, et à l'abri de l'air. Ils liquéfient rapidement le ciment pectique et les cadres cellulosiques, détruisent l'amidon et les autres glucides. Les parois cutinisées, lignifiées, minéralisées,

subsistent seules, intactes, dans la purée des tissus désagrégés, dont s'exhale l'odeur fétide de l'acide butyrique. Le rouissage des textiles a, pendant très longtemps, été réalisé grâce aux bactéries butyriques et, spécialement, au B. amylobacter: les tiges de lin, de chanvre, etc..., étaient abandonnées dans l'eau, à l'intérieur de cuves closes ; après action du microbe, il suffisait de laver les fibres, isolées au milieu des tissus liquéfiés. La dénudation des feuilles mortes qui, à la longue, lorsqu'elles ont séjourné à l'humidité et à l'abri de l'air, se trouvent réduites au squelette de leurs nervures, c'est-à-dire de leurs faisceaux ligneux, est également l'œuvre des bactéries butyriques.

On voit donc toute l'importance pour la vie de cette forme de fermentation et l'utilité des agents microbiens accomplissant le rôle de ferment butyrique dans la nature.

CHAPITRE V

La fermentation lactique

Nous arrivons à présent à l'exposé de la fermentation lactique qui constitue pour les études que nous avons entrepris dans ce travail le chapitre historique principal.

D'après le schéma des fermentations hydrocarbonées antérieurement indiqué, on constate que la fermentation lactique n'est en somme que le cinquième mode de fermentation de Neuberg : l'aldéhyde pyruvique se transforme en acide lactique grâce à un enzyme: l'aldéhyse-mutase ou glyoxalase, phénomène qui est d'ailleurs reversible car on peut par fermentation obtenir à partir de l'acide lactique de l'acide pyruvique et la fermentation se continuant encore, de l'alcool et de l'acide acétique. Ces faits ont été constatés par Kayser et par Mazé.

Pasteur a montré pour la première fois que la fermentation lactique naturelle était dûe au développement dans le liquide qui fermente d'une bactérie spéciale qu'il a isolé en culture pure et dont il a précisé les caractères. Cette espèce est très commune dans le lait qu'elle contamine dès qu'il est exposé à l'air et où elle se développe d'une façon luxuriante aux dépens du lactose. Elle acidifie peu à peu le liquide qui est au moment de sa sortie du pis très légèrement alcalin ou à réaction amphotère et forme si les circonstances culturales sont bonnes, une quantité d'acide lactique telle que le lait se coagule dès qu'on le chauffe ou même spontanément à la température ordinaire: on dit alors que le lait est tourné. Pasteur démontre donc que la fabrication de l'acide lactique était un processus microbien.

L'acide lactique découvert par Scheele dans le lait tourné, en 1780, a été retrouvé ensuite dans des matières organiques en voie de décomposition, matières très diverses, mais présentant le caractère commun d'être riches en glucides.

Tous les procédés empiriques de préparation de cet acide tinrent compte de ce fait : on traitait par exemple (méthode de Bensch), une solution de sucre de canne et d'acide tartrique par du fromage pourri délayé dans du lait caillé, et l'on ajoutait un peu de craie pulvérisée ; au bout de quelques jours, à 30°, on pouvait péniblement séparer du mélange une quantité notable de lactate de chaux.

Liebig et la plupart des savants pré-pastoriens donnaient de ces phénomènes une interprétation purement chimique : dans la fermentation lactique comme dans beaucoup d'autres, les matières en putréfaction (ici le fromage pourri) « reportent sur d'autres corps l'état de décomposition — c'est-à-dire l'état d'instabilité moléculaire — dans lequel elles se trouvent elles-mêmes ».

En étudiant le dépôt formé au cours de la fermentation lactique de laits sucrés, Pasteur découvrit une bactérie dont il précisa les caractères morphologiques ; il démontra que, sans elle, la formation d'acide est impossible ; en revanche, il suffit d'ajouter, à un milieu sucré quelconque, quelques cellules du microbe pour y déterminer l'apparition de cette substance.

La bactérie lactique attaque de très nombreux hexoses ; dans le lait, elle hydrolyse d'abord le lactose en glucose et en galactose puis fait fermenter ces derniers ; dans les macérations végétales, elle transforme le glucose ou le fructose provenant de l'hydrolyse du saccharose, de l'amidon, des celluloses, etc... Chaque molécule d'hexose est dédoublée, par le ferment, en deux molécules d'acide lactique suivant l'équation :

$$C^6H^{12}O^6 = 2CH^3\ CHOHCOOH.$$

De plus, quelques sous-produits, variables suivant les cas (acides acétique, formique, succinique, etc...) apparaissent en faible quantité ; mais aucun gaz n'est dégagé.

Dans le lait, la formation d'acide détermine la précipitation de la caséine à l'état de grumeaux (lait tourné ou lait aigre) ; d'ailleurs, la présence de l'acide ne tarde pas à empêcher le développement microbien (le lait caillé ordinaire ne contient guère plus de 1 % d'acide lactique). C'est pourquoi l'addition de craie, neutralisant l'acide à mesure qu'il appa-

raît, peut seule permettre une fermentation prolongée ; il se forme du lactate de chaux et du gaz carbonique se dégage.

Pasteur n'avait fait que décrire le microbe de la fermentation, sans rechercher s'il correspondait à une seule ou à plusieurs espèces, mais les bactériologistes qui l'ont suivi (Lister, Kauser, Beijerinck, etc...) ont démontré la multiplicité des ferments lactiques ; on en a décrit plus de cent espèces, différant faiblement par les formes et les dimensions de leurs cellules, l'aspect de leurs cultures, leur comportement biochimique. La plupart de ces microbes sont aérobies ; quelques-uns paraissent pouvoir fonctionner en anaérobiose.

De plus, de nombreux microbes, notamment des bactéries pathogènes (Colibacille; Bacille typhique; Vibrion cholérique; Méningocoque, etc...) sans être de véritables ferments lactiques, capables de dédoubler intégralement la molécule d'hexose en deux molécules d'acide lactique, décomposent les sucres en produisant des quantités plus ou moins notables de cet acide.

Les fermentations lactiques jouent, dans l'alimentation de l'homme et en médecine, un rôle extrêmement important.

Elles intéressent au premier chef toutes les industries laitières, soit qu'il s'agisse, pour conserver au lait ses qualités naturelles, d'éviter leur action (pasteurisation du lait), soit, au contraire, qu'il faille la provoquer et la diriger (production du lait caillé, fabrication du fromage).

Kéfir, Koumys, Yogourth, etc... Ces noms désignent des produits fabriqués par l'action, sur du lait, de microbes particuliers, parmi lesquels figurent toujours des ferments lactiques.

Le Kéfir est une boisson gazeuse, alcoolique et acide, d'origine caucasienne, préparée avec du lait traité par un ferment spécial, offrant l'aspect de grumeaux ou de masses élastiques blanches ou jaunâtres, mamelonnées (grains de Kéfir). Mis au contact du lait, à une température convenable (15-20°), ces éléments grandissent et le transforment en Kéfir : ces transformations conditionnent la prolifération du ferment. Celui-ci est constitué par l'association d'une ou plusieurs espèces de levures et de plusieurs espèces de bactéries lactiques; à partir du sucre du lait, les levures fabriquent l'alcool et le gaz carbonique et les bactéries l'acide lactique, produits dont

le mélange fait l'originalité du Kéfir, et aussi celle du Koumys : car cette boisson originaire de l'Asie centrale, ressemble beaucoup au Kéfir ; elle est, comme lui, gazeuse, alcoolique et acidulée ; mais les microorganismes au moyen desquels on la fabrique sont encore mal connus ;

Le Yogourth, d'origine bulgare, est un lait caillé à l'aide d'un ferment spécial, très actif (Maya), constitué surtout, semble-t-il, par une bactérie (Bacillus bulgaricus) ; la présence de levures donnerait, de plus, un arôme spécial.

Les bactéries lactiques interviennent encore dans d'autres fermentations alimentaires, notamment dans la fabrication de la choucroute (la choucroute est un produit fermenté par des bactéries lactiques) et dans la panification (le levain de la fermentation panaire contient non seulement des levures, mais encore des microbes lactiques).

On sait que certains ferments lactiques sont utilisés en thérapeutique comme antiseptiques intestinaux ; le développement de bacilles lactiques dans l'intestin peut, en effet, en acidifiant le milieu, s'opposer efficacement à la pullulation des microbes de la putréfaction, microbes producteurs de substances toxiques (amines, acide butyrique, etc...) mais exigeant un milieu alcalin.

Dans tout un autre ordre d'idées, le pouvoir fermentaire présenté par une bactérie pathogène vis-à-vis des sucres est un précieux élément de diagnostic : le microbe que l'on cherche à identifier est ensemencé sur un milieu alcalin contenant tel ou tel sucre, en présence de teinture de tournesol ; si le microorganisme fait fermenter le sucre, le milieu rougit par suite de la formation d'acide lactique ; sinon, il reste bleu ; par exemple, la Colibacille rougit la gélose lactosée et tournesolée, tandis que le Bacille typhique est dépourvu de ce pouvoir. L'addition au milieu de carbonate de chaux permet, en outre, d'apercevoir un dégagement gazeux s'il s'agit d'un microbe producteur d'acide lactique (formation de lactate de chaux).

En se basant sur ces expériences biochimiques et certaines similitudes d'aspect des cultures, Wurtz et Leudet veulent identifier le bacille lactique avec le Bacillus lactis aerogenes. Denys et Martin vont même plus loin et rangent avec le ferment lactique le Bacillus lactis aérogenes, le Pneumobacille

de Friedlaender et, moins catégoriquement toutefois, le Colibacille.

On voit donc l'importance de cette fermentation dans la nature en général et on a pu se rendre compte d'autre part de la difficulté qui existe à différencier et à classer le bacille de la fermentation lactique dans un groupe homogène. C'est pour cette raison que nous aurons l'occasion au cours de nos travaux personnels de revenir sur les techniques et les conclusions qu'il faut employer si on envisage une caractérisation nette de ces bactéries de la fermentation lactique dans la classification générale des microorganismes.

CHAPITRE VI

Le Lait

Avant d'entamer l'exposé de nos travaux personnels, nous tenons à dire quelques généralités sur le lait, milieu essentiel pour la préparation du lait caillé produit qui fait le sujet de notre thèse. Nous donnons tout d'abord la définition et les standards du lait et des produits lactés établis par l'inspection de l'alimentation (F.I.D.) des Etats-Unis d'Amérique.

1° Le lait est la sécrétion entière, fraîche, propre, obtenue par trayage complet d'une ou de plusieurs vaches saines, convenablement nourries et soignées ; on en exclut la sécrétion produite quinze jours avant et cinq jours après le vélage ; on devra prolonger ces périodes autant qu'il sera nécessaire afin que le lait soit, en fait, exempt de colostrum.

2° Le lait pasteurisé est le lait qui a été soumis à une température non inférieure à 145° Fahrenheit pendant au moins 30 minutes. Après quoi on le refroidit vivement jusqu'à 60°, ou plus bas encore.

3° Le lait homogénisé est le lait qui a été traité mécaniquement de façon à en modifier les propriétés physiques, eu égard surtout à la structure et aux dimensions des globules gras.

4° Le lait écrémé est le lait dont on a retiré entièrement la crème.

5° Le petit lait est le produit, doux ou aigre, qui reste quand on a enlevé la matière grasse ou la crème par le procédé du barattage ; il ne contient pas moins de 8,5 % d'extrait sec.

6° Le petit lait fermenté est le produit obtenu en acidulant du lait pasteurisé, écrémé ou partiellement écrémé, au moyen d'une culture convenable de bacilles lactiques. Il ne contient pas moins de 8,5 % d'extrait sec.

7° Le lait de chèvre, le lait de brebis sont les sécrétions

lactées, fraîches, propres, exemptes de colostrum, obtenues par la traite complète d'animaux sains autres que les vaches, convenablement soignées et entretenues et conformes au nom de l'animal dont il provient.

8° Le lait concentré est le produit résultant de l'évaporation d'une notable partie de l'eau du lait, avec rectification, si nécessaire, du rapport matière grasse à extrait sec, par addition ou enlèvement de crème. Il ne contient pas moins de 7,8 % de matières grasses et pas moins de 25,5 % d'extrait sec; il faut en outre que la somme du pourcentage de matières grasses et d'extrait sec ne soit pas inférieure à 33,7 %.

9° Le lait condensé sucré est le produit obtenu par l'évaporation d'une notable partie de l'eau du lait auquel on ajoute du sucre (saccharose). Il ne contient pas moins de 28 % d'extrait sec et pas moins de 8 % de matières grasses.

10° Le lait écrémé concentré est le produit obtenu par évaporation d'une grande partie de l'eau du lait écrémé, il ne contient pas moins de 20 % d'extrait sec.

11° Le lait écrémé concentré et sucré est le produit obtenu par évaporation de la plus grande partie de l'eau du lait écrémé, auquel on ajoute du sucre (saccharose) ; il ne contient pas moins de 24 % d'extrait sec.

12° Le lait sec est le produit résultant de l'enlèvement de l'eau du lait, il ne contient pas moins de 26 % de matières grasses et pas plus de 5 % d'humidité.

13° Le lait écrémé sec est le produit résultant de l'enlèvement de l'eau du lait écrémé ; il ne contient pas plus de 5 % d'humidité.

14° Le lait malté est le produit fabriqué en combinant le lait complet avec un liquide provenant d'un brassage de malt d'orge broyé et de farine de blé, avec ou sans addition de chlorure de sodium, de bicarbonate de soude, de bicarbonate de potasse (de manière à obtenir le maximum d'action enzymatique de l'extrait de malt), et en enlevant l'eau. Le produit qui en résulte contient 7,5 % de matières grasses, mais pas plus de 3,5 % d'humidité.

Crème

1° La crème ou crème fraîche est cette portion du lait riche en matières grasses, qui monte à la surface du lait quand on le laisse reposer ou qui s'en sépare quand on le soumet à

la centrifugation. Ele ne contient pas moins de 18 % de matières grasses et pas plus de 0,2 % d'acidité calculée en acide lactique.

2° La « crème fouettée » est la crème qui ne contient pas moins de 30 % de matières grasses.

3° La « crème homogénéisée » est la crème traitée mécaniquement de façon à modifier ses propriétés physiques, surtout en ce qui concerne la structure et les dimensions des globules gras.

4° La « crème évaporée » est la crème dont une grande partie de l'eau a été enlevée par évaporation.

Beurre

1° D'après une loi du Congrès approuvée le 4 mars 1923, le beurre a été défini et le standard suivant adopté : ainsi qu'en a décidé la loi sur les aliments et les médicaments du 30 juin 1906, on devra comprendre sous le nom de « beurre » le produit alimentaire ordinairement connu sous le nom de beurre fait exclusivement de lait ou de crème ou des deux à la fois, avec ou sans sel ordinaire, avec ou sans addition de matière colorante et ne contenant pas moins de 80 % de son poids de matières grasses, toutes tolérances comprises.

Fromages

1° Le « fromage » est le produit sain obtenu avec du lait caillé de vache, écrémé ou partiellement écrémé, ou du lait d'autres animaux, avec ou sans addition d'autres crèmes, en coagulant la caséine à l'aide de présure ou à l'aide d'acide lactique ou autres enzymes convenables. On traite ou non ensuite le lait caillé par la chaleur ou la pression ou par des ferments activant la maturation, dans des moules spéciaux, en l'assaisonnant. Par décision du Congrès, le fromage peut également contenir de la matière colorante.

Aux Etats-Unis, le terme fromage sans qualificatif s'applique au « Fromage de Cheddar », ou « Fromage Américain », ou « Fromage Américain de Cheddar ».

2° Le « fromage de lait entier » est fait avec du lait entier.

3° Le « fromage de lait partiellement écrémé » est fait avec du lait partiellement écrémé.

4° Le « fromage de lait écrémé » est fait avec du lait écrémé.

5° Le « Cheddard Fromage », le « Fromage Américain », le « Fromage Américain de Cheddar » désignent les fromages obtenus par le procédé Cheddar en chauffant et pressant le lait caillé résultant de l'action de la presure sur le lait entier. Il contient 39 % d'eau et, dans sa substance sèche, renferme 50 % de matières grasses, au moins.

6° Le « fromage de lait caillé remué » (stirred curd cheese), le « fromage de lait caillé sucré » (sweet crud cheese) sont les fromages produits par le procédé Cheddar modifié et obtenus avec du lait caillé par l'action de la présure sur le lait entier. Le traitement particulier du lait caillé dès qu'on en a retiré le petit lait, donne un fromage d'une composition toute spéciale, plus lâche, plus granuleux que le Cheddar. Il contient 50 % de matières grasses dans sa partie exempte d'eau.

7° Le «fromage ananas » (pineapple cheese) s'obtient à l'aide du procédé Cheddar, avec du lait caillé pressé provenant de l'action de la présure sur le lait entier. Le lait caillé prend la forme d'un ananas avec les stigmates qui caractérisent ce fruit. Pendant sa période de maturation, on le frotte entièrement et on le recouvre d'une huile convenable contenant ou non de la gomme laque. Il renferme comme le précédent 50 % de matières grasses.

8° Le « fromage Lienburger » est obtenu par le procédé Lienburger et provient du lait caillé non pressé obtenu par l'action de la présure sur le lait entier. On fait mûrir ce lait caillé dans une atmosphère humide déterminant une fermentation spéciale. Il contient 50 % de matières grasses.

9° Le « fromage brique » (brick cheese) est le fromage à maturité rapide obtenu à partir du lait caillé, pressé à la suite de l'action de la présure sur le lait complet.

10° Le « fromage de Stilton » est le fromage obtenu par la méthode Stilton ; il provient de lait caillé non pressé, obtenu par action de la présure sur du lait entier, avec ou sans addition de crème. Pendant la durée de la maturation, une moisissure spéciale d'un vert bleuâtre s'y développe ; c'est ainsi que ce fromage acquiert une apparence marbrée ou tachetée quand on le coupe.

11° Le « fromage Gonda » est obtenu par le procédé Gonda ; il provient du lait caillé chauffé et pressé, obtenu par

l'action de la présure sur le lait entier, sa croûte colorée à l'aide de safran. Il contient 40 % de matières grasses.

12° Le « fromage de Neufchatel » est obtenu par le procédé de Neufchatel avec du lait caillé non chauffé, par l'action combinée de la fermentation lactique et de la présure sur le lait entier. Le lait caillé, précipité par centrifugation, est pétri jusqu'à devenir d'une consistance semblable à celle du beurre, on le presse ensuite dans des formes soit pour la consommation immédiate, soit pour le laisser mûrir. Il contient 50 % de matières grasses.

13° Le « fromage à la crème » est le produit non encore arrivé à maturité, obtenue par le procédé de Neufchâtel et obtenu d'un lait additionné de crème. Il contient 65 % de matières grasses.

14° Le « Roquefort » est obtenu par le procédé de Roquefort, de lait caillé non chauffé, non pressé, par l'action de la présure sur le lait de brebis avec ou sans addition d'une quantité de lait de chèvre. On inocule à ce lait caillé une espèce particulière de moisissure (Penicillium roqueforti) ; il acquiert sa qualité en raison du développement de cette moisissure. Quand il a atteint sa complète maturité, il devient friable et a une apparence marbrée ou tachetée à la section.

15° Le « Gorgonzola » est obtenu par le procédé Gorgonzola, du lait caillé provenant de l'action de la présure sur le lait entier. Il mûrit dans une atmosphère demi-humide où se développe une moisissure d'un vert blanchâtre, qui lui donne une section marbrée ou tachetée.

Fromages de lait entier ou fromages de lait partiellement écrémé.

16° Le « fromage Edam » est obtenu par le procédé Edam; le lait caillé provenant de l'action de la présure sur le lait entier ou partiellement écrémé, est chauffé et pressé. Il est d'ordinaire de forme sphérique, on le recouvre d'une couche d'huile convenable et d'une substance colorante rouge inoffensive.

17° L' « Emmenthal » ou « fromage Suisse », est produit par le procédé d'Emmenthal ; on l'obtient de lait caillé chauffé, pressé, provenant de l'action de la présure sur le lait entier ou en partie écrémé; il mûrit sous l'action des bactéries qui se trouvent présentes et qui dégagent des gaz, cause des « yeux » ou trous caractéristiques de ce fromage. Il est connu

au Etats-Unis sous le nom de « Schweizer » et contient 45% de matières grasses.

18° Le « Camembert » est obtenu suivant le procédé de Camembert et provient de lait caillé non chauffé non pressé par l'action de la présure sur le lait entier ou légèrement écrémé; il arrive à maturité suivant le développement d'une moisissure spéciale (Penicillium camenberti) à sa surface et contient 45% de matières grasses.

19° Le « Brie », dû au procédé de Brie, est préparé avec du lait caillé non chauffé, non pressé, obtenu par l'action de la présure sur le lait entier, sur le lait auquel on ajoute de la crème ou le lait en partie écrémé; sa maturité dépend du développement d'une moisissure à sa surface extérieure.

20° Le « Parmesan » dû au procédé Parmesan, provient du lait caillé chauffé et très fortement pressé, produit par l'action de la présure sur du lait en partie écrémé. Ce fromage dont le développement demande beaucoup de temps est recouvert d'une couche d'huile convenable.

Fromages de lait écrémé.

21° Le « fromage de Chaumières » (cottage cheese ou Schmierkäse) est un fromage non arrivé à maturité; il est préparé avec du lait caillé non chauffé, obtenu par l'action de fermentations lactiques, ou d'acide lactique, ou de présure, ou encore par un mélange de ces éléments, sur du lait écrémé avec ou sans addition du petit lait. Le lait caillé égoutté est parfois mélangé avec de la crème; on le sale ou on l'assaisonne plus ou moins.

Fromages du petit lait.

22° Les fromages désignés sous ce nom sont produits suivant divers procédés avec les éléments du petit lait. Il y en a une grande variété, chacun ayant une appellation suivant la nature du procédé employé pour le fabriquer, exemple : « Ricotti », « Zieger », « Primost », « Pysort ».

Crème glacée ou Ice cream.

1° La « crème glacée » ou « Ice cream » est le produit glacé fait de crème, de sucre et aromatisé; elle contient 14% de matières grasses.

2° La « crème glacée aux fruits » est le produit glacé, fabriqué avec de la crème, du sucre et des noisettes saines (non rances); elle contient 12% de matières grasses.

Produits lactés divers.

Le « petit lait » ou « sérum » est ce qui reste après que la matière grasse et la caséine ont été séparées pendant la fabrication des fromages.

Le lait au point de vue physique est une émulsion naturelle parfaite où les globules de beurre sont maintenus en suspension dans un liquide sucré (solution de la lactose) grâce à la présence d'un albuminoïde spécial, la caséine.

Cet aliment se distingue des autres matières nutritives par la présence de lactose en proportion importante. Il constitue donc l'aliment de transition entre le régime carné, uniquement composé d'albuminoïdes et de graisses, et le régime végétarien où la graisse disparait presque pour laisser la place prépondérante aux matières hydrocarbonées et en même temps l'azote diminue sensiblement. L'heureuse composition du lait en fait un aliment complet, du moins pour la première partie de la vie. Il devient toutefois bientôt insuffisant à cause du manque de principes minéraux; mais, si on lui adjoint le pain, il peut suffire indéfiniment à la nourriture de l'homme. Il a toujours tenu du reste une des premières places dans l'alimentation. Avant la guerre de 1914, la France produisait annuellement près de 80 millions d'hectolitres de lait.

La consommation du lait dans les divers pays est très différente et elle dépend de la culture générale de la population. On admet même que la consommation du lait est proportionnelle à l'évolution culturelle d'un peuple.

De par sa composition favorable et son pouvoir nutritif très prononcé le lait constitue naturellement un milieu de choix pour la culture et la croissance des bactéries. Une propreté excessive et une hygiène très poussée sont donc les conditions essentielles pour obtenir un lait sain se prêtant à la fabrication des sous-produits de qualité constante et appréciable.

DEUXIEME PARTIE

Travaux Personnels

CHAPITRE I.

Considérations générales sur le lait caillé bulgare de brebis

Nous nous sommes proposé d'étudier dans notre travail, le véritable lait caillé bulgare de brebis désigné aussi sous le nom de lait aigre (kvasseno mleko) ou de Yogourth. Il faut en distinguer nettement les différents produits préparés soit en Europe, soit en Amérique et désignés sous le même nom, mais obtenus avec le lait de vache. Il y a, d'autre part, une différence sensible entre le lait caillé bulgare et les aliments similaires préparés avec le lait de vache et la présure bulgare appelée « maya ». En Bulgarie même, on emploie le terme Yogourth dans certaines localités pour un lait aigre obtenu par l'acidification spontanée du lait introduit dans un pot ayant servi au préalable à la préparation de lait caillé. On obtient ainsi un produit filant, presque liquide, d'une acidité très prononcée et d'une odeur forte de vinaigre surtout quand l'aliment est âgé de quelques jours.

Nous tenons à faire observer comme KVATCHKOFF, que toutes les études très nombreuses effectuées en France, en Allemagne, en Amérique et même en Russie au moyen de produits appelés Yogourth, ont eu uniquement trait au lait caillé de vache. Il n'est donc pas étonnant que les résultats de tous ces travaux, même de ceux qui ont été effectués à l'aide de maya bulgare soient forts divergents puisque l'aliment de base, le lait de vache, a une composition et des propriétés physiologiques toutes différentes d'un pays à l'autre. Il ne peut donc pas y avoir une relation entre ces travaux et les expériences pratiquées sur le véritable lait

caillé bulgare préparé au moyen de lait de brebis et de maya bulgare.

Metchnikoff a attribué l'action du lait caillé bulgare à la production de l'acide lactique, véritable agent microbicide.

On s'est préoccupé en Europe de fabriquer des poudres, des tablettes, des pastilles de Yogourth, peut-être dans le but de conserver sa flore microbienne; cependant R. Oehler, dans son étude, publiée en 1911 dans la Zentralbl. für Bakteriol. affirme qu'il n'y a pas trouvé de bactéries du lait à l'état vivant. A titre d'essai, nous nous sommes servi d'une pareille poudre allemande sans aucun résultat ; le lait ne se caille pas, ce qui semble prouver l'absence de bactéries vivantes.

König dans son ouvrage : Untersuchung von Nahrungs-Genussmittel und Gebrauchsgegenstände décrit de la façon suivante la préparation du lait caillé :

On fait bouillir le lait jusqu'à réduction de la moitié de son volume, puis on le laisse refroidir à 40° environ dans un pot de terre. On y introduit ensuite la présure et on recouvre le tout avec une couverture. Après une attente de 8 à 9 heures, le lait est caillé. Le produit ainsi obtenu est assez liquide et on s'en sert comme boisson en Albanie sous le nom de chutly-yogourth. La présure employée est le maya bulgare encore désignée sous le nom de podkvassa, ou de kechk chez les Syriens et les Afghans. Ce produit contient de 0,3 à 0,5 % d'acide lactique.

En Allemagne on affirme que le lait caillé gras (Buttermilch) serait identique au lait caillé bulgare. Le Buttermilch en opposition au Magermilch (lait écrémé) est du lait non écrémé contenant la totalité du beurre qu'on laisse s'acidifier spontanément.

En Egypte, il existe une boisson lactée semblable au Kéfir appelée Roba qu'on prépare avec du lait de vache, du lait de bufflesse ou du lait de chèvre. Cette préparation se fait aussi à une température de 40° environ et on utilise une présure analogue au maya. Ce produit est cependant tout différent du lait caillé bulgare, puisque il renferme du glucose, du saccharose et du maltose et que la fermentation acide est très peu prononcée.

L'araka ou ayran de la Sibérie et du Turkestan est une boisson alcoolique dérivée du lait. Il se prépare d'après Zales-

KY dans des grands récipients et une fois la fermentation accomplie on a recours à la distillation. Le premier produit distillé contient 7 à 8% d'alcool et possède une saveur désagréable, dûe à la présence d'acides volatils. Après une seconde distillation l'araka s'enrichit en alcool et son goût devient assez agréable.

D'après APPEL, on prépare un champagne lacté ou punch lacté en mélangeant le Kéfir ou le koumys avec du sucre, du miel et des extraits de diverses racines; puis on ensemence cette préparation au moyen de champignons inférieurs du genre Mycoderma pour obtenir une sorte de boisson douce et écumeuse appelée galacmuse, ce qui signifie champagne lacté.

SISIN et BARHAN étudient diverses préparations lactées utilisées en U. R. S. S. appelées prostokvacha, varenz ou madjun.

En Scandinavie, on prépare un lait filant appelé « Taëtte ». Cet aliment est très acide et le processus de maturation dure ici 3 ou 4 jours, le liquide fermenté se conserve à une température de 10° environ pendant 10 mois sans perdre ses qualités organoleptiques.

Le lait filant hollandais « Lange Wei » est caillé à l'aide d'une présure contenant exclusivement un streptocoque, qui a été isolé par BŒCKEL et qui sert uniquement à la fabrication de fromage. Dans toutes ces préparations nous avons à faire avec des fermentations mixtes acido-lactiques d'un côté et alcoolique de l'autre. La consistance du liquide de fermentation est en rapport avec la quantité de ferments alcooliques et diminue avec l'augmentation du pourcentage en alcool. La boisson type de cette fermentation mixte est le koumys.

Si on étudie l'ensemble de ces recherches effectuées dans les différents pays, on constate donc que l'on emploie un peu partout le lait de vache ou le lait de bufflesse, différents du lait de brebis bulgare.

D'autre part, si l'on envisage les études bactériologiques et cryptogamiques pratiquées sur la flore contenue dans les différentes présures ou dans le maya utilisé pour la fabrication des laits caillés on constate une discordance très prononcée et une spécification de germes très dissemblables, quant à leurs propriétés morphologiques et culturales toute différente. C'est ainsi que nous trouvons dans une première catégorie

de recherches, comme agent principal de la fermentation lactique des streptocoques. Nous ne mentionnons que le Streptococcus lactis de Luersen et Kühn isolé du prokicha acidifié spontanément, le Streptococcus lactis acidis de Sisin et Barhan isolé en U.R.S.S. du prostokvacha. Le Streptococcus lactis hollandais isolé par Bœckel du « Lange Wei ».

Une deuxième catégorie de germes capables d'engendrer la fermentation lactique est constituée par des bâtonnets que l'on appelle communément le bacille bulgare. Dans la même classe il faudrait ranger le Bactérium acidolactici de Pasteur, le Bactérium lactis acidi de Leihmann, le Bacillus acidificans longissimus de Lafar, le Thermobactérium bulgaricum de Kantardjieff, le Bactérium casei de Koroleff, le Bactérium acidophilum étudié en Amérique et qui habite normalement l'intestin de l'homme.

Une troisième catégorie de ferments lactiques est constituée par des champignons inférieurs rentrant dans les genres Mycoderma ou Saccharomyces, comme il ressort des nombreux travaux effectués à ce sujet.

Afin d'étudier ces deux questions principales qui déterminent la qualité et la spécificité du lait caillé bulgare de brebis en opposition avec tous les autres laits caillés, nous avons jugé utile d'effectuer d'une part des analyses chimiques et physiques pour caractériser les différences et la valeur du lait de brebis bulgare par rapport aux autres laits communément employé et d'autre part nous avons entrepris des études bactériologiques afin de caractériser, en adoptant les règles déterminées par la Société des Bactériologistes Américains et publiées dans l'ouvrage : « Déterminative Bactériology » de David H. Bergey, aussi nettement que possible la flore et les différents agents contenus dans le maya bulgare, prélevé en Bulgarie même et étudié sur place.

CHAPITRE II.

Méthode employée pour l'analyse des laits et exposé des résultats

Afin d'étudier l'influence du lait sur la qualité des différents Yogourths préparés en Bulgarie et dans les autres pays nous avons tenus à effectuer au préalable des analyses de lait de vaches et de lait de brebis vivant en Bulgarie. Pour déterminer les moyennes de composition de ces aliments, nous avons employé les techniques de la méthode officielle française d'analyse des laits. Pour chaque échantillons de lait prélevé dans la campagne environnante de Stara-Zagora en Bulgarie, nous avons effectué l'analyse suivante : détermination de la densité à 15°, matière grasse, caséine brute, caséine corrigée, lactose hydraté, extrait sec total, extrait dégraissé et cendres.

Nous donnons ci-dessous les modes opératoires employés pour ces différentes expériences :

Densité : pour la détermination de la densité du lait nous avons employé le lactodensimètre de Quevenne et Bouchardat, en faisant subir au résultat de la lecture la correction de la température. La lecture a été toujours effectuée au sommet du ménisque convexe du lactodensimètre.

Matière grasse : Les procédés employés pour le dosage de la matière grasse dans le lait sont très nombreux. Nous avons intentionnellement utilisé la méthode officielle française par pesée, où l'on utilise les réactifs suivants : Alcool à 65° acidifié à 1/1.000 par de l'acide acétique; alcool à 35°; alcool à 95°; éther à 65 °.

On place dans un petit vase à précipité, 25 cc. d'alcool acidifié. On mesure exactement 10 cc. de lait et on les verse goutte à goutte dans le réactif précédent en agitant constamment. On laisse reposer 1/4 d'heure et on filtre le coagulum

formé sur un filtre taré de 10 à 11 centimètres de diamètre, lavé au préalable au moyen d'alcool. On recueille le liquide filtré dans une fiole de 100 cc. Le filtre une fois égoutté, on lave le vase à précipité à trois reprises avec 10 cc. d'alcool à 35° et on porte le liquide de lavage chaque fois sur le filtre. On termine une quatrième fois avec 10 cc. d'alcool à 35°. On réunit dans la fiole jaugée précédente la totalité des liquides alcooliques et on complète le volume à 100 cc. au moyen d'eau distillée.

On conserve ce liquide qui servira au dosage du lactose. Le filtre contenant le coagulum formé par le beurre et la caséine est essoré entre deux papiers buvards et introduit dans un appareil de Soxhlet. On verse sur le filtre 10 cc. d'alcool à 95° et dans le petit ballon taré de l'appareil on introduit 100 cc. d'éther qui servent à l'épuisement du coagulum. L'extraction est effectuée à une température de 40° environ au bain-marie pendant 4 heures. Au bout de ce temps, on démonte l'appareil, on évapore le solvant contenu dans le ballon et on pèse celui-ci. La différence entre le poids après l'extraction et son poids primitif donne la quantité de beurre pour 10 cc. de lait.

Caséine : Le filtre introduit dans l'appareil de Soxhlet contient après l'épuisement la caséine et les sels insolubles. Ce filtre est séché à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant environ 3 heures, puis on le pèse. La caséine brute ainsi déterminée est incinérée ensuite dans un creuset taré, dont l'augmentation finale de poids représente la quantité de cendres de la prise d'essai. Ce poids retranché de celui de la caséine brute nous donne le poids de la caséine pure.

Lactose : Le dosage du lactose a été fait sur le filtrat obtenu antérieurement après le traitement du lait au moyen de l'alcool à 65° acidifié par l'acide acétique. Pour le dosage du lactose même, nous avons utilisé la méthode de Bertrand. Etant donné que nous considérons cette méthode comme classique nous ne nous croyons pas obligé de la décrire ici en détail.

Extrait sec : Pour la détermination de l'extrait sec, nous avons opéré sur 10 cc. de lait placé dans une capsule de nickel à fond plat et ayant les dimensions prescrites par la méthode officielle. Nous avons chauffé pendant 7 heures au bain-marie

à niveau constant sans addition d'aucune substance coagulante. Nous avons cependant eu soin de faciliter la dessiccation en perçant au moyen d'une aiguille la pellicule qui se forme à la surface du lait pendant l'évaporation de l'eau. Après le temps de chauffage indiqué on essuie l'extérieur de la capsule, on la laisse refroidir dans un dessiccateur, puis on la pèse pour obtenir par différence le poids de l'extrait sec de 10 cc. de lait.

Extrait dégraissé : On appelle extrait dégraissé l'extrait sec sans le beurre. On obtient donc ce facteur en retranchant du poids de l'extrait sec total celui de la matière grasse.

Les cendres : sont obtenues en partant du matériel ayant servi à la détermination de l'extrait sec. L'incinération au four à moufle est poussée jusqu'à obtention de cendres jaunes-blanchâtres.

Nous donnons ci-dessous un tableau exprimant nos résultats pour 5 analyses de lait de vaches prélevé dans des étables différentes. Ces laits ne constituent pas le produit de secrétion d'une seule vache, mais nous avons eu soin de mélanger dans chaque écurie les laits de différentes bêtes et à partir du mélange ainsi constitué, nous avons prélevé les échantillons pour nos différentes analyses. Pour les laits de brebis nous avons employé la même technique et nos résultats expriment donc la composition des laits de brebis élevées dans 5 fermes différentes. Nos résultats constituent donc des moyennes portant environ une centaine de bêtes chaque fois. moyennes portant environ sur une centaine de bêtes chaque fois.

TABLEAU N° 1

Échantillon de lait N°	Densité à 15°	Matières Grasses	Caséine brute	Caséine Corrigée	Lactose hydraté	Extrait sec total	Extrait sec dégraissé	Cendres	Observations
1	1,0312	41,25	32,12	30,39	44,96	130,25	89,00	7,52	
2	1,0306	38,29	31,50	30,90	46,58	130,52	92,23	8,03	
3	1,0286	38,03	32,76	31,27	45,76	130,24	92,21	8,14	Laits de brebis
4	1,0304	41,32	35,28	33,00	45,76	136,17	94,85	6,80	
5	1,0302	55,96	36,50	34,70	44,18	143,60	92,64	7,52	
6	1,0322	32,51	31,32	28,97	44,92	121,52	89,01	7,90	
7	1,0381	74,72	56,24	51,15	47,41	192,15	117,43	10,24	
8	1,0390	76,15	50,75	46,18	48,01	198,10	121,95	11,08	
9	1,0377	79,64	59,43	52,23	48,91	186,83	107,19	9,14	Laits de vaches
10	1,0398	68,95	61,00	47,94	41,02	181,65	112,70	12,84	
11	1,0372	85,44	56,76	49,90	46,58	199,28	113,84	9,96	
K	—	33,70	—	—	36,60	129,80	86,10	8,20	Lait de vache d'après König
C	—	31,00	—	—	27,80	114,90	83,90	7,90	Lait de vache d'après Combe
B	—	11,20	—	—	23,90	81,30	70,10	3,30	Lait de brebis d'après Combe
R	—	48,00	—	—	—	125,00	77,00	—	Lait de vache d'après Reinhardt
L	1,033	35,00	34,00	—	50,00	125,00	90,00	6,00	Lait de vache d'après Lecoq
L	1,038	74,00	56,00	—	50,00	190,00	116,00	10,00	Lait de brebis d'après Lecoq

Si nous envisageons l'ensemble de ces résultats, nous pouvons tirer les conclusions suivantes en ce qui concerne la composition des deux sortes de laits. On constate qu'il y a une différence essentielle entre la teneur en matière grasse et en caséine surtout. Les matières grasses du lait de brebis bulgare dépassent le poids du beurre du lait de vache bulgare de plus d'un tiers de leur poids. Si nous considérons que la teneur en graisse du lait de vache bulgare est déjà très prononcée par rapport au lait de vache de l'Europe occidentale, on se rend immédiatement compte de l'importance de ce fait pour la préparation et la qualité des laits caillés dans les deux régions.

Nous tenons, pour fixer les idées, à indiquer ici que pour l'Allemagne par exemple, l'inspection des produits alimentaires admet un taux minimum de graisse de 2,70% de lait, la Suisse et la France prescrivent une teneur de 3%. Nous voyons à l'examen de nos analyses que la moyenne de nos échantillons de lait examinés dépassent largement 4%.

Il doit donc exister déjà une différence notable entre le Yogourth préparé avec du lait de vache bulgare et celui effectué au moyen de lait de vache des pays occidentaux.

D'autre part, le rôle de la caséine dans le lait caillé bulgare ne peut sûrement pas être négligé et si on considère la proportion très élevée de ce corps dans le lait de brebis bulgare on conçoit immédiatement que le Yogourth doit avoir une valeur alimentaire de beaucoup supérieure aux autres produits similaires.

La teneur en lactose n'est pas très différente dans le lait de vache et dans le lait de brebis, il y a cependant une légère augmentation pour le dernier; cependant, nous nous rendons compte que le sucre de lait présent dans les deux substrats doit par l'action de ferments amener une production d'acide lactique à peu près semblable.

Cependant, nous croyons que ce ne sont pas seules les propriétés physico-chimiques, dont nous avons ci-dessus essayé de dégager les caractères différentiels, qui interviennent dans la préparation des laits caillés et qui peuvent déterminer leur valeur alimentaire. C'est pour cette raison que nous avons eu recours à des déterminations d'un autre ordre s'adressant plus spécialement aux propriétés hygiéni-

ques du lait; nous avons ainsi déterminé la catalase, la réductase du lait et l'essai de son pouvoir fermentatif. On comprend l'importance de la présence de catalase et de réductase dans le lait, pour la fabrication des yogourths, si on se rappelle le rôle essentiel de l'oxygène dans la fermentation lactique et au cours du développement des bactéries lactiques.

Détermination de la catalase : Chaque lait contient une certaine quantité de catalase, enzyme qui a la propriété spécifique de décomposer l'eau oxygénée avec un dégagement d'oxygène libre. L'indice de la catalase indique le nombre de centimètres cubes d'oxygène dégagé pour 100 cc. de lait.

Pour la détermination de cet indice, nous avons employé l'appareil de Lobeck et Ottiker. Pour cette technique on effectue la réaction entre le lait et l'eau oxygénée dans des petits flacons de fermentation spécialement préparés, munis d'un bouchon en caoutchouc percé d'un trou, dans lequel on visse un clou spécialement adapté servant à la fermeture hermétique du flacon pendant la marche de la réaction et pouvant être dégagé et remplacé sans perte de gaz par le petit tube gradué servant à la mesure de l'oxygène formé. Le mode opératoire est le suivant : on introduit dans le flacon de fermentation 5 cc. d'eau oxygénée à 1%, puis on y ajoute 10 cc. exactement mesurés de lait, on ferme hermétiquement et on porte au bain-marie à 25° pendant 2 heures. A ce moment, on remplit le petit tube gradué formant gazomètre avec de l'eau jusqu'au niveau O indiqué sur l'appareil et on fixe ce tube avec les précautions nécessaires sur le bouchon de caoutchouc perforé. Au moment où le clou de fermeture est complètement libéré, l'oxygène formé monte immédiatement dans le petit gazomètre et y déplace le niveau d'eau introduit. La quantité d'eau déplacée directement lisible sur l'échelle du tube gradué est proportionnelle à la quantité des gaz formés. Le nombre de centimètres cubes lu multiplié par 10 donne l'indice de la catalase.

Détermination de la réductase : La détermination de la présence de réductase, enzyme normalement présent dans le lait a une importance capitale pour contrôler la richesse de la flore bactérienne du lait. On a en effet, par des expériences rigoureuses, constaté que le lait de vache frais et normal ne produit la réduction d'une solution donnée de bleu de méthy-

lène qu'après 12 heures, tandis que des laits souillés et riches en bactéries occasionnent cette réduction déjà au cours des premières heures de contact. On admet pour le lait de vache de bonne et de mauvaise qualité le temps limite de décoloration de 3 heures.

Pour déceler et mesurer la réductase, nous avons utilisé des flacons de fermentations se fermant au moyen d'un dispositif à ressort portant un bouchon de caoutchouc. Nous y avons introduit un centimètre cube d'une solution de bleu de méthylène de la concentration suivante : solution saturée alcoolique et bleu de méthylène 5 centimètres cubes; eau distillée 195 centimètres cubes. Puis on y ajoute 40 cc. de lait ; on ferme le flacon et on porte au bain-marie à 40° en y plongeant les flacons complètement. On observe de demi-heure en demi-heure les échantillons de lait pour noter le temps de décoloration.

Détermination du pouvoir fermentatif du lait : Il nous semble que cette détermination est très importante pour notre étude, puisqu'elle nous renseigne immédiatement en nous montrant si le lait en expérience se prête à la préparation des laits caillés.

Cette expérience a pour base le fait que la plupart des bactéries lactiques se développe activement à une température de 37 à 40°. Par ce processus, le lait subit des modifications plus ou moins variées qui permettent de caractériser les propriétés fermentatives même du lait. Ces modifications ont été très bien étudiées par A. Peter et nous tenons à rapporter le tableau établi par cet auteur, puisqu'il nous permet de classer les laits que nous avons examinés, suivant différents types.

Pour le mode opératoire, on utilise les mêmes flacons de fermentation décrit pour la réaction antérieure. On les place remplis complètement au moyen de lait au bain-marie chauffé à 40° pendant 24 heures. On contrôle l'aspect et les modifications du lait après 6, 9, 12 heures, etc., on note principalement le temps après lequel on observe une modification du lait et on distingue une coagulation mucilagineuse, une coagulation caséeuse, une coagulation filante, une coagulation gazeuse, etc...

TABLEAU N° 2

Epreuve de fermentation d'après A. PETER

(A appliquer pour des échantillons de lait placés pendant 15 à 24 heures à la température de + 38 à 40° C)

Type Fl = liquide	Type Gl = gélatineux	Type K = caséeux	Type Z = floconneux	Type Bl = gazeux	*Observations spéciales*
La coagulation ne s'est pas encore produite.	Coagulation régulière, masse gélatineuse, absence de petit-lait.	Coagulum plus ou moins compact. Présence de petit-lait verdâtre et acide.	Coagulum floconneux ou granuleux. Petit - lait blanchâtre, jaunâtre ou varié.	Coagulation avec dégagement gazeux.	Caractères non mentionnés dans les 5 types précédents.
Fl 1 + complètement liquide encore doux ou légèrement acide. Fl 2 + Sous la couche de crème, présence d'un peu de petit-lait. — Pas d'autres symptômes de coagulation. Fl 3 + Début de coagulation constatable.	Gl 1 + complètement coagulé, masse gélatineuse, sans présence de petit-lait. Gl 2 + Coagulum avec quelques fentes de bulles gazeuses. Gl 3 ? Coagulum avec des fentes, des bulles gazeuses et des fissures. Début de la formation de petit-lait.	K 1 + Coagulum caséeux en masse compacte. Présence de petite quantité de petit-lait. K 2 ? Coagulum caséeux réuni en forme de crayons. Petit-lait verdâtre et légèrement acide. K 3 ? Coagulum gazeux fibreux, très compacte. Petit - lait plutôt blanchâtre.	Z 1 + Coagulum encore granuleux ou partiellement même compact. Z 2 ? Coagulum floconneux, sécrétion de petit - lait très nette. Z 3 O Coagulum formé de gros flocons, déchiqueté par le petit-lait blanchâtre ou sans couleur définie.	Bl 1 ? Bulles gazeuses dans la crème ou dans le coagulum. Bl 2 O Présence de bulles gazeuses en grandes quantités. Bl 3 O Coagulum en état spongieux par l'inclusion de gaz.	Sch : Epreuve de souillure positive. ? E : Indice leucocytaire positif. O FR : Crème filamenteuse. ? FM: Petit-lait filamenteux. ? B : Goût amer ? St : Odeur répugnante. O

+ : lait sain, apte à l'emploi.

? : lait anormal, épreuve de fermentation douteuse.

O : lait anormal, impropre à la fabrication de lait caillé ou de fromages.

Détermination de la richesse leucocytaire et des souillures accidentelles : Au cours de nos recherches au moyen de lait de vache et de lait de brebis, nous avons pu constater que le lait de brebis était beaucoup plus riche en catalase que les laits d'autre provenance. Etant donné que la détermination de la richesse en catalase a pour but dans les analyses alimentaires, en général, de caractériser des laits provenant de vaches malades ou de toute façon d'écuries malpropres et peu hygiénique, nous avons été amenés à compléter nos recherches pour déterminer l'abondance éventuellement plus grande des leucocytes et des souillures dans nos laits de brebis.

Pour réaliser ces déterminations, nous ne nous sommes pas adressés au tube de centrifugation de Trommsdorf employé habituellement dans ces sortes de recherches, mais nous avons employé un tube de centrifugation capillaire modifié dans le genre du tube de Rosenthal. Ce tube dont la partie capillaire est beaucoup plus longue que celui de Trommsdorf, est à sa partie inférieure ouvert et peut être fermé à l'aide d'un couvercle à vis en bakkélite. Nous avons, au cours des manipulations, fixé ce couvercle solidement sur le tube capillaire à l'aide d'une solution de gélatine. De cette façon, ces tubes de centrifugation peuvent être très facilement nettoyés et en même temps il est possible d'utiliser les dépôts formés dans le tube capillaire et le liquide surnageant se trouvant dans la partie supérieure large, pour les recherches bactériologiques.

La détermination des souillures accidentelles a été effectuée avec le même dispositif. Nous avons récupéré les résidus retenus dans le tube capillaire. Ceux-ci ont été ensuite lavés à l'eau dans un tube de centrifugation ordinaire jusqu'à ce que l'eau de lavage soit devenue complètement limpide. Les dépôts sont ensuite traités à l'aide d'une solution diluée d'ammoniaque, puis lavés à l'aide d'eau et enfin au moyen d'alcool et d'éther. Finalement, nous avons centrifugé et séché le tube de centrifugation jusqu'à poids constant. La différence entre le poids initial et le poids final a donné la quantité de souillure accidentelle se trouvant dans la prise d'essai (10 cc).

L'examen bactériologique : Les examens bactériologiques des laits analysés ont été effectués par l'analyse microscopique directe à l'aide de coloration simple, de la coloration au Gram et de la coloration de Ziehl-Neelsen.

CHAPITRE III

Analyses bactériologiques et biochimiques des différents échantillons de lait :

Nous exprimons dans le tableau qui suit les résultats des différentes analyses effectuées au point de vue de la flore bactériologique et des propriétés biochimiques constatées à l'aide des méthodes ci-dessus énoncées.

TABLEAU N° 3

Examens bactériologiques directs et recherches biochimiques

Echantillon de lait N°	Coques en amas Gram +	Coques en Chaînettes Gram +	Coques Gram —	Bâtonnets Gram +	Bâtonnets Gram —	Bâtonnets Ziehl +	Flore cryptogamique	Réductase en heure	Indice de catalase	Indice leucocytaire	Epreuve de fermentation d'après le tableau de Peter	Epreuve de souillure mgr	Conditions
1	++	++	0	±	++	0	+	5,00	42	0,75	K 2	96	Se prêtant à la fabrication de lait caillé devant être consommé avant maturation définitive
2	+	++	0	+	+	0	++	3,00	38	1,25	Z 1	125	Idem
3	+	+	0	++	++	0	+	3,30	35	1,20	K 3	132	Idem
4	+++	+	+	+	+++	0	++	3,00	54	0,68	B 2	95	Inapte à la préparation de lait caillé
5	0	±	0	+	0	0	±	8,00	35	0,42	Gl 1	75	Lait sain, apte
6	±	±	0	+	0	0	0	9,00	32	0,48	Fl 2	66	Lait sain, apte
7	+	±	0	+	±	0	9	8,00	58	0,45	Gl 2	69	Lait sain, apte
8	++	±	0	+	0	0	+	12,00	62	0,50	Gl 1	55	Lait sain, apte
9	+	±	0	±	0	0	0	12,00	58	0,42	Fl 2	50	Lait sain, apte
10	+++	++	+	+	++	0	+++	2,30	85	2,25	Bl 2	195	Inapte à la consommation
11	++	+	0	+	0	0	0	12,00	62	0,45	K 1	50	Lait sain, apte

En envisageant l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que dans les laits de vaches n° 1, 2 et 3, la flore saprophyte est anormalement augmentée, l'épreuve de la réductase est accélérée, l'indice de catalase et l'indice leucocytaire sont sensiblement normaux, l'épreuve de la souillure accidentelle est positive. Ces laits se prêtent d'après nos conceptions et expériences, à la fabrication de lait caillé ou de fromage, mais ces sous-produits devraient être consommés avant la maturation définitive, car dans ce cas ils aboutissent à un état défavorable pour la consommation humaine.

Le lait n° 4, ayant donné dans les expériences physico-chimiques antérieures des résultats satisfaisants au point de vue de sa composition est inapte à la préparation de lait caillé ou de fromage puisque l'épreuve de fermentation a donné un résultat correspondant au type Bl 2 du tableau de Peter, malgré que l'indice leucocytaire et l'épreuve de souïllure aient été sensiblement normaux, par contre, les épreuves de la réductase, de la catalase et la flore bactérienne sont absolument anormales et concordent avec l'épreuve de fermentation.

Les lait n° 5 et 6 sont des laits de vaches normales recueillis dans des conditions hygiéniques, sûrement satisfaisantes et l'épreuve de fermentation s'est effectuée suivant le type Gl apte pour la préparation de sous-produits.

Pour les laits de brebis examinés nous voyons qu'à l'exception de l'échantillon n° 10, tous les autres se prêtent très bien pour la préparation du lait caillé ou de fromage parce que l'épreuve de fermentation de tous ces laits de brebis s'est effectué soit suivant le type Gl, soit suivant le type Fl.

Le lait de brebis n° 10 est inapte non seulement à la préparation de sous-produits, mais il s'agit malgré les résultats presque normaux des analyses chimiques d'un échantillon bactériologiquement fortement contanimé laissant pressentir l'existence de bactéries pathogènes dangereuses pour la consommation.

Mais le point essentiel pour ces analyses est la forte présence de catalase dans les laits de brebis malgré des indices leucocytaires et les épreuves de souillure bactériologiques ou minérales tout à fait normaux. L'exactitude de nos analyses est aussi prouvée par la concordance de l'épreuve

de fermentation avec les autres résultats et il semble que le lait de brebis contient normalement une teneur en catalase idiogène beaucoup plus prononcée que les laits de vaches.

Si nous résumons les faits constatés par l'ensemble de ces analyses physico-chimiques, bactériologiques et biochimiques, nous pouvons dire que les laits de brebis se distinguent des laits de vache par les caractères suivants : augmentation de la teneur en matière grasse et en caséine, teneur sensiblement identique en matière hydrocarbonée, augmentation de l'indice de catalase, et épreuve de fermentation sensiblement plus stable.

Au point de vue bactériologique, il faut retenir que l'analyse chimique seule ne suffit pas pour éprouver la qualité d'un lait. L'infection du lait joue un rôle au moins aussi considérable que sa composition chimique. Dans le temps, on a fort discuté si le lait quittait le pis des femelles en état de stérilité. On est aujourd'hui d'accord pour admettre que le lait sort de la glande lactée saine de l'animal mammifère à l'état stérile, à condition que les bacilles n'aient pas pénétré dans le canal du pis et se soient propagés de là jusqu'à la cisterne ou même plus haut. Il est tout à fait naturel que le lait de la première traite soit infecté par la flore microbienne qui pullule au niveau de l'orifice mammaire, mais celui des traites suivantes devient absolument pur et peut être considérée comme stérile.

Le degré d'infection du lait dépend naturellement aussi des conditions hygiéniques de l'étable, de la propreté du fermier, des récipients et des conditions atmosphériques des locaux de manipulation ultérieure.

Une autre circonstance qui joue un grand rôle pour la contamination du lait est le fourrage et les litières. D'après Kursteiner, on trouve, dans 1 gr. de paille de litière, une moyenne de 200.000.000 bactéries.

Pour que les microbes introduits accidentellement dans le lait se développent, il faut réaliser une certaine quantité de conditions, ainsi l'humidité, la température, l'aération, la réaction ionique interviennent dans ce phénomène.

Nous distinguons généralement 4 groupes importants de bactéries :

1°) Les bactéries psychrophiles, qui se développent à des températures ne dépassant pas + 10°.

2°) Les bactéries mésophiles se développant à des températures moyennes oscillant entre + 15° à + 27°.

3°) Les bactéries thermophiles, se développant à des températures au-dessus de + 35°.

4°) Les bactéries anaérobies, qui ne se développent qu'en l'absence de l'air.

Les bactéries saprophytes, qu'on trouve le plus souvent dans le lait rentrent dans le groupe des mésophiles. Ces germes sont les éléments les plus actifs pour la décomposition des matières albuminoïdes se trouvant dans le lait. La peptonisation de la caséine est donc la première phase de la décomposition spontanée du lait. C'est cette flore qui est à considérer comme la plus dangereuse dans la préparation des fromages et des laits caillés. La deuxième phase de la transformation bactérienne du lait est la fermentation lactique occasionnée par les bacilles lactiques qui font partie du groupe thermophile.

L'augmentation de l'acidité du lait inhibe ensuite l'action des ferments lactiques et grâce à l'anaérobiose qui s'installe dans le substrat, nous assistons à la fermentation butyrique occasionnée par les bactéries anaréobies. Pour l'étude de la flore bactérienne des laits caillés, nous avons donc à faire à des microbes de la fermentation lactique. Avant d'attaquer l'exposé de nos recherches à ce sujet nous tenons à donner le mode de préparation du yogourth bulgare.

CHAPITRE IV.

Préparation du lait caillé bulgare

On emploie, en Bulgarie, différents procédés pour préparer le lait caillé, nous indiquons celui qui nous a donné personnellement le meilleur résultat et qui répond le mieux aux exigences de l'hygiène. On met le lait frais dans un grand récipient et on le chauffe sur le feu nu à la température de 95° pendant une demi-heure. Par ce procédé on inhibe le développement ultérieur des bactéries saprophytes. On retire ensuite le récipient du feu et on introduit le lait dans des tasses après avoir écumé la mousse qui s'est formée à la surface du liquide pendant le chauffage. Cette manipulation est effectuée au moyen d'une grande cuillère spéciale à l'aide de laquelle on verse le lait dans les tasses. Cette opération doit être effectuée d'assez haut pour que le lait tombé dans les tasses forme une nouvelle mousse empêchant les bactéries extérieures de pénétrer dans le substrat en profondeur et protégeant en même temps le lait contre le refroidissement. On enveloppe ensuite les tasses dans des couvertures de sorte que la température intérieure se stabilise à peu près entre 38 et 42°. Finalement on introduit à travers la couche de mousse et de crème qui s'est formée à la surface, les ferments lactiques : le maya. On couvre le tout avec une grande couverture de laine et on laisse reposer pendant 8 à 9 heures. Si on manipule bien, la température initiale de 42° tombe pendant ce temps à 25 ou 26°. Dans ces conditions le lait est coagulé, on trouve à sa surface une couche épaisse de crème composée de graisse et de matières albuminoïdes. Ce yogourth est épais et prend à peu près la consistance de fromage frais.

Dans les laiteries plus modernes, on prépare le lait caillé sensiblement de la même façon, mais en utilisant des étuves facilement réglables aux températures voulues.

Observations microscopiques concernant le lait caillé.

Nous avons préparé à titre comparatif du lait caillé en utilisant le même ferment lactique, mais des laits de provenance soit de vache, soit de bufflesse, soit de brebis. Nous donnons ci-dessous le résultat de notre expérimentation.

Le lait caillé de vache : A la surface du yogourth, on trouve une croûte jaunâtre constituée par la crème. L'épaisseur de cette croûte est insignifiante si on opère dans les conditions énumérés plus haut, mais elle peut être augmentée par la prolongation du temps de refroidissement du lait (de 45 à 25°).

Le coagulum sous-jacent est lisse et blanc ivoire. On note l'absence complète du lactosérum. Le goût de ce yogourth est doux-amer, l'arôme est agréable. Si on prélève à l'aide d'une cuillerée une petite portion du coagulum, la cupule formée se remplit assez vite par un liquide laiteux ; le coagulum manque donc de fermeté et se démolit assez rapidement. Par battage, le lait caillé se transforme en une masse sirupeuse et homogène.

Le lait caillé de bufflesse : La croûte de crème qui se forme à la surface est ici très épaisse; elle est blanche comme le coagulum qui se trouve au fond des tasses. La consistance de ce lait caillé est plus dure et plus élastique. Si on pratique l'expérience précédemment indiquée en enlevant à l'aide d'une cuillère une petite portion de coagulum, l'excavation ainsi formée se remplit beaucoup plus tardivement au moyen du lacto-sérum.

Au battage, le coagulum se réduit en petits morceaux diminuant progressivement, mais prenant finalement la grandeur de petits pois. De toute façon, on n'arrive jamais à former un liquide homogène sirupeux. Des grains durs plus ou moins grands restent constamment présents.

Le lait caillé de chèvre: La croûte de ce yogourth est toujours blanche, le coagulum prend un aspect granuleux, sa consistance est peu prononcée et le lacto-sérum apparaît vite si on dégage le coagulum. A la suite du battage on n'arrive pas à former une émulsion homogène ; il persiste toujours des portions du coagulum plus ou moins granuleuses. Le goût est agréable, mais ce yogourth garde un arôme spécifique peu prononcé, rappelant l'odeur typique du lait de chèvre.

Le lait caillé de brebis : Ce yogourth présente une croûte beaucoup plus épaisse que celle constatée dans les cas précédents. Elle prend ici une teinte jaunâtre. Le coagulum est aussi légèrement coloré en jaune, sa consistance est dure et présente une élasticité très prononcée. On ne constate aucune formation de lacto-sérum et si on enlève une partie de sa masse à l'aide d'une cuillerée, il apparaît encore beaucoup plus tardivement et plus difficilement que pour le lait caillé de bufflesse. Au battage, on obtient une masse homogène peu fluide rappelant la consistance d'un sirop très épais. On y voit très rarement des toutes petites particules dures, vestiges de la croûte superficielle. Le séjour dans le bain-marie à 40° facilite le battage et l'homogénéisation de l'émulsion. Son goût est très agréable et rafraîchissant et dégage un léger parfum aromatique.

D'après les caractères microscopiques et organoleptiques que nous venons de donner, on voit donc qu'il y a une grande différences entre les différents yogourths préparés, même en Bulgarie et on constate que les propriétés chimiques et biologiques que nous avons antérieurement pu mettre en évidence pour les laits de brebis doivent intervenir pour une large part dans la préparation du lait caillé en influant sur la valeur alimentaire de ce produit.

CHAPITRE V

Examens Bactériologiques des Yogourths

Marcoff écrit dans son ouvrage de *Microbiologie appliquée* les détails suivants sur l'histoire de la Bactériologie des Yogourths : « On ignore à quelle époque le lait caillé fut introduit en Bulgarie. D'après certaines données, ce produit aurait son origine dans les montagnes Rhodopes où des bergers nomades auraient utilisé, il y a 200 ans, les racines fraîches de « Tchernokos » (Inula Helenium) pour préparer le maya. Dans ce but, ils auraient pressé ces racines fraîches pour recueillir le suc. Celui-ci mélangé à du lait frais non bouilli occasionne au bout de quelques heures, une acidification et une coagulation du milieu. Ce substrat a ensuite été utilisé pour continuer à préparer le véritable lait caillé bulgare. Il est à présumer que les enzymes végétales de la racine de l'Inula n'étaient pas seuls responsables de cette fermentation et que certaines variétés du type Bactérium bulgaricum ont été spontanément ou accidentellement introduites dans cette préparation. Avec le temps, ces bactéries se sont définitivement adaptées à vivre dans le lait et sont ainsi devenues les agents principaux du kvasseno mleko (lait caillé bulgare).».

Plus tard, on s'est occupé de caractériser la flore bactérienne des différents yogourths, tant en France qu'en Amérique, en Allemagne et surtout en Russie. On a donc fortement discuté le rôle spécifique du Bactérium bulgaricum car on ne trouvait que des variétés de cette bactérie, pour la première fois étudiée à fond par Metchnikoff. On avait, à côté de ces différentes variétés du bacille de Metchnikoff, trouvé un grand nombre de germes capables de produire la fermentation lactique et principalement des streptocoques et des streptobacilles. Ce fait n'est pas étonnant, car tous ces travaux ont été effectués avec des laits de provenance diffé-

rente et avec des présures très variées; nulle part il n'est question du véritable lait caillé bulgare de brebis dans lequel Metchnikoff avait isolé sa bactérie.

Luersen et Kuhn ont confirmé plus tard les expériences de Metchnikoff et, ceci à peu près à la même époque que Grigoroff. Cet auteur a caractérisé le Bacterium bulgaricum de la façon suivante : Bactérie Gram positive, immobile, ayant des dimensions très variées, capable de former de véritables chaînes, sans production de spores. Elle est aérobie avec un optimum de développement entre 45 et 50°. Ce bacille décompose le sucre de lait en acide lactique lévogyre et il ne peptonise pas la caséine. Cultivé dans du lait, il le précipite sans production de gaz. On le cultive avec facilité dans un milieu au lacto-sérum tandis que son développement est peu luxuriant sur des autres milieux utilisés habituellement en bactériologie.

La présence de certains streptocoques et de levures paraît être favorable à son développement. D'après certaines recherches, le bacille bulgare vivrait en symbiose avec le streptocoque acide du lait. Celui-ci, Gram positif, est presque toujours présent dans les laits caillés. Indépendamment de ces germes, on découvre très souvent encore la présence de Saccharomycètes capables de décomposer aussi le lactose.

Pour Kantardjieff, il n'existe dans le lait caillé bulgare qu'un seul lacto-ferment : le Thermobactérium bulgaricum ou le bacille de Metchnikoff. Contrairement aux assertions de Grigoroff et de Koroleff cet auteur a démontré que l'association du bacille bulgare au streptocoque et au diplocoque du lait n'est pas nécessaire, et que pour obtenir du bon lait caillé bulgare, le Bacterium bulgaricum est pleinement suffisant et donne les meilleurs résultats à tous les points de vue.

Etant donné ces faits, nous avons entrepris quelques examens bactériologiques dans le but d'isoler le Bactérium bulgaricum à l'état de pureté. A cet effet, nous avons finalement adopté la technique suivante : Le lait de brebis a été chauffé au bain-marie jusqu'à 70°. Puis on centrifuge ce lait encore chaud pour obtenir la coagulation rapide du lait. On décante le lacto-sérum; on dégraisse celui-ci par une seconde centrifugation et on filtre à travers un filtre préalablement mouillé, pour recueillir le lacto-sérum pur. On y ajoute 1 %

de peptone et 0,5 % de chlorure de sodium. On dissout le tout à l'autoclave en chauffant pendant 5 minutes à 105°, puis on filtre. A ce filtrat, nous avons ajouté 2 % de gélose. On prépare d'autre part, des boîtes de Pétri stérilisées avec une légère couche de carbonate de calcium, puis on introduit le lacto-sérum gélosé encore chaud dans les boîtes de Pétri, on mélange intimement la craie et le milieu en agitant avec prudence et on laisse solidifier le substrat ainsi préparé.

D'un autre côté, nous avons effectué des prélèvements de yogourth à l'aide d'une pipette de 1 cm^3. Nous avons délayé celui-ci dans 500 cc. de sérum physiologique stérile et quand nous l'avons jugé utile, nous avons effectué des dilutions successives jusqu'à l'obtention d'une émulsion permettant l'isolement facile des différents germes se trouvant dans le yogourth. A cet effet, nous avons introduit dans chaque boîte de Pétri 2 cc. d'émulsion bactérienne après avoir liquéfié la gélose. On réalise une agitation suffisante pour délayer intimement le prélèvement dans le milieu gélosé, puis on laisse refroidir et on porte le tout à une température de 40°.

Les colonies de microorganismes qui produisent une fermentation lactique sont facilement reconnaissable sur ce milieu à la suite de la formation d'une auréole périphérique qui apparaît par la dissolution de la craie au contact de l'acide lactique formé. Il nous a été ainsi facile au moyen de dilutions de yogourths allant de 1/500 jusqu'à 1/1.000.000 d'isoler définitivement les différentes bactéries lactiques.

Une autre réaction très intéressante nous a permis de contrôler l'exactitude de notre technique. Si on verse à la surface du milieu gélosé une faible couche d'une solution d'eau oxygénée à 3 %, on n'observe au niveau des colonies de bactéries lactiques aucun dégagement de gaz. Ces organismes se caractérisent donc par l'absence totale de catalase libre. Par contre, au niveau des colonies microbiennes n'ayant pas d'action sur le lactose, on constate l'apparition de bulles gazeuses et de mousse dues à la présence de catalase libre. Nous tenons à souligner ce fait, puisque nous avons pu constater dans nos expériences antérieures que le lait de brebis contient naturellement une quantité beaucoup plus prononcée de catalase libre que les laits de vache analysés par nous. Ce

phénomène doit donc favorablement influencer la croissance des bactéries lactiques.

Après avoir eu ainsi la possibilité d'isoler les différents germes de la fermentation lactique, nous avons réussi à cultiver le Bactérium bulgaricum à l'état de pureté sur les milieux suivants : nous utilisons 100 cc. de lait de brebis écrémé auquel nous ajoutons 3 gr. de gélose et nous chauffons à l'ébullition. D'autre part, nous mélangeons un blanc d'œuf avec 100 cc. d'eau et nous réunissons le lait gélosé avec la solution albumineuse. Nous portons le tout à ébullition jusqu'à ce que toutes les matières protidiques précipitent. Nous filtrons le milieu à chaud à travers un papier filtre CHARDIN et nous répartissons le filtrat dans des tubes de culture que nous stérilisons à 110° pendant une demi-heure. On laisse refroidir les tubes pour obtenir un milieu gélosé incliné. Ce substrat constitue assurément pour le Bactérium bulgaricum le milieu de choix, et les colonies qui évoluent à 40° au cours de 3 à 4 jours sur la surface gélosée prennent un aspect très caractéristique rappelant des petits amas de coton ou des têtes de choux-fleur.

Propriétés morphologiques et culturales du Bactérium bulgaricum.

Le Bactérium bulgaricum se présente à la coloration simple sous forme de petits bâtonnets grêles de 6 à 8μ de longueur sur 0,5μ de largeur, il est immobile, à extrémités légèrement arrondies et se réunit souvent en chaînettes.

Il se colore bien par les couleurs d'aniline et il est Gram positif. Ses propriétés biologiques sont les suivantes : l'optimum cultural est situé entre + 40 et + 42°, la croissance est inhibée pour les températures inférieures à + 22° et supérieures à + 56°.

Les cultures restent cependant vivantes à + 12° et par repiquage et séjour à + 40°, ces cultures reprennent leur développement.

La concentration en ions H pour l'optimum de récolte est située entre pH = 6,4 et pH = 6,8.

Le développement du Bactérium bulgaricum est nulle sur milieu de gélatine, de gélose ou sur bouillon ordinaire. Sa croissance est faible sur milieu gélosé glucosé ou gélosé lactosé. Sur milieu de pomme de terre nous n'avons pu constater

aucune croissance. Le lait est un bon milieu, mais le milieu de choix est sans aucun doute le lacto-sérum additionné de peptone soluble.

Les propriétés biochimiques du bacille bulgare que nous avons étudiées sont les suivantes : il ne secrète ni présure, ni caséase, ni gélatinase, ni tryptase. Nous n'avons pas pu constater la formation d'indol, ni d'anhydride sulfureux.

En ce qui concerne l'assimilation des glucides, nous avons pu constater qu'il attaque le lactose, le glucose, le maltose et la mannite suivant l'ordre décroissant de notre énuméération. Sur ces milieux, nous n'avons pas pu démontrer le développement de gaz.

Nous tenons à donner ici les résultats des expériences effectuées déjà en 1906 par Bertrand et Weisweiller sur l'action du ferment bulgare sur les 3 principales substances qui existent dans le lait; ces auteurs ont trouvé les faits suivants: le Bacterium bulgaricum solubilise une petite quantité de la caséine, environ le dixième, dont il utilise seulement une faible partie pour édifier ses cellules.

Son action, sur les matières grasses, est encore moins sensible; il les saponifie, mais seulement dans une proportion très minime. Enfin, il hydrolyse à l'aide d'une lactase qui est sans doute une endolactase, la presque totalité du sucre de lait; il transforme ensuite le glucose et le galactose qui résultent de cette hydrolyse en un mélange d'acide lactique gauche et d'acide lactique droit, mélange dans lequel ce dernier acide prédomine. A côté de l'acide lactique dont la quantité atteint facilement 25 gr. par litre, il y a un peu d'acide succinique, environ 1/2 gr. par litre, à peu près autant d'acide acétique, et probablement de très petites quantités d'acide formique.

Ces auteurs n'ont trouvé parmi les substances volatiles, ni alcool, ni acétone, ni acétylméthylcarbinol.

En continuant ces recherches, Gabriel Bertrand et Duchacek ont constaté que le ferment bulgare a, vis-à-vis des sucres, les propriétés suivantes : 1°) que parmi les sucres réducteurs non hydrolysables, le glucose, le mannose, le galactose et le lévulose sont fermentescibles, tandis que l'arabinose, le xylose et le sorbose ne le sont pas ; 2°) que parmi les sucres hydrolysables le lactose seul est fermen-

tescible, le saccharose et le maltose résistent ; 3°) enfin, que la mannite n'est pas transformée en acide lactique.

Si on compare ces résultats excessivement détaillés avec ceux que nous avons pu mettre en évidence à l'aide de notre Bactérium bulgaricum isolé en Bulgarie, on est étonné de l'exactitude de ces recherches déjà anciennes des auteurs français et il est évident que ces chercheurs avaient travaillé avec une souche de Bacterium bulgaricum absolument pure.

CHAPITRE VI

Recherches chimiques et bactériologiques sur le lait caillé bulgare

Ayant à notre disposition des cultures pures de Bacterium bulgaricum et de différents autres ferments lactiques dont un streptocoque et le Mycoderma lactis, nous avons jugé intéressant de préparer du lait caillé de brebis et de vache en ensemençant ces germes soit isolément, soit mélangés, sur ces laits.

Nous avons d'autre part employé quelques échantillons de lait caillé de brebis et de vache préparés d'après la technique que nous avons antérieurement indiquée et par conséquent coagulés au moyen de maya.

Ces différents laits caillés de brebis et de vache ont été analysés d'après les techniques que nous avons exposé lors des essais sur le lait même. Nous exprimons les résultats de ces analyses dans le tableau suivant, en n'indiquant que les valeurs moyennes de trois ou quatre analyses effectuées pour chaque sorte de lait.

TABLEAU N° 4

Analyses chimiques des différents laits caillés

Echantillons de laits caillés (moyenne de 4 analyses)	Matières grasses	Caséine Brute	Caséine solubilisée	Lactose	Extrait sec	Extrait dégraissé	Acide lactique	Alcool	Cendres
Lait caillé de brebis..... (fermentation mixte) (préparé par nous)	116,25	39,40	40,14	37,90	263,00	146,75	31,50	1,95	7,95
Lait caillé de vache. ..... (fermentation mixte) (préparé par nous)	71,50	35,85	35,50	58,70	230,50	159,00	24,70	2,07	3,80
Lait caillé de brebis..... (fermentation pure du Bacillus bulgaricus)	114,00	47,75	16,35	44,62	254,50	140,50	32,50	0,88	8,20
Lait caillé de brebis..... (fermentation mélange de culture : Bacillus bulgaricus + Streptocoques)	—	22,22	48,70	87,50	—	—	15,75	2,20	—
Lait caillé de vache. ..... (fermentation pure du Bacillus bulgaricus)	75,80	42,50	8,15	49,50	—	—	17,90	1,22	—

En considérant ces résultats, nous pouvons tirer les conclusions suivantes : le lait caillé de brebis obtenu par la fermentation mixte a une valeur alimentaire supérieure à celui du lait caillé de vache. La dégradation du lactose dans le premier lait caillé est de beaucoup plus accentuée que dans le deuxième. La solubilisation de la caséine est à peu près semblable dans les deux sortes de Yogourths.

Par contre, dans le lait caillé de brebis préparé avec le Bacillus bulgaricus seul, nous constatons une attaque beaucoup plus faible de la caséine, la fermentation lactique est sensiblement égale à celle du lait caillé de brebis provenant de maya, l'augmentation des matières grasses est sensiblement constante dans ces deux sortes de Yogourth.

Le résultat est tout autre pour le lait caillé de brebis que nous avons préparé en employant un mélange des deux souches Bacilus bulgaricus + streptocoque. Ici nous constatons une peptonisation très prononcée de la caséine et l'hydrolyse du lactose est beaucoup moins prononcée.

Nous voyons que le Bacterium bulgaricum a un pouvoir fermentescible du lactose beaucoup plus prononcé que les autres ferments lactiques. En effet, il forme à partir de ce sucre jusqu'à cinq fois plus d'acide lactique que le streptocoque lactique que nous avons isolé. Le lait caillé de brebis bulgare préparé avec du maya doit renfermer une proportion très accentuée du Bacterium bulgaricum qui donne seul à ce produit sa valeur organoleptique et nutritive. D'un autre côté, nos recherches démontrent l'exactitude des expériences de Kantardjieff qui a déjà constaté que le Thermobacterium bulgaricum seul est capable de produire un Yogourth répondant à toutes les exigences. Cet auteur a déjà constaté que :

1°) le lait caillé au moyen du streptocoque thermophile possède bien le goût du lait caillé bulgare de brebis, mais ne satisfait pas aux qualités du Yogourth véritable.

2°) le lait caillé à l'aide d'un mélange du Bacterium bulgaricum et du streptocoque thermophile possède le goût du lait ordinaire.

3°) le lait caillé avec le Bacterium bulgaricum en combinaison avec le streptocoque thermophile et le Saccharomyces lactis possède le goût du lait caillé ordinaire mais dégage une odeur désagréable.

4°) l'échantillon préparé avec la culture pure de Bacterium bulgaricum possède seul le goût et l'arôme du meilleur lait caillé de brebis bulgare.

Nous pouvons pleinement confirmer les constatations faites par cet auteur.

La différence entre le vrai lait caillé de brebis bulgare et les autres Yogourths doit évidemment être en rapport étroit avec l'accoutumance définitive du Bacterium bulgaricum au lait de brebis, ce bacille étant devenu, comme Grigoroff l'exprime, un microbe autochtone spécial du lait bulgare de brebis. Les laits d'autres provenances et les différentes présures utilisées en dehors de la Bulgarie ont sûrement une influence sur le goût et les valeurs nutritives des Yogourths puisque nous n'avons dans ces préparations plus à faire avec une fermentation presque exclusivement lactique mais avec des fermentations mixtes et les sous-produits de dégradation ne sont plus limités à ceux provenant de la décomposition du lactose mais aussi et souvent principalement à la fermentation de la caséine. Ce phénomène a été déjà constatable dans nos analyses où nous nous sommes adressé soit à du lait de vache soit à l'emploi de ferments contenant les streptocoques. Que les produits préparés en Europe occidentale doivent être différents, semble tout à fait naturel si l'on pense à l'action de la flore bactérienne saprophyte multiple qui doit se manifester dans ces laits caillés. Nous ne mentionnerons que le pouvoir dégradateur sur la caséine des Tyrothrix isolés du lait par Duclaux, des Bacillus casei décrits par Freudenreich, du Bacillus lactis acidi de Leichmann, des Bacillus subtilis, mesentericus et des nombreuses autres bactéries rangées par la classification américaine dans le groupe des bacilles Gram négatif faisant fermenter le lactose et produisant des gaz, tels que les Escherichia et les Aerobacter.

Nous pouvons facilement contrôler cette action protidolytique de ces différents germes par le rapport de maturation dont la technique est indiquée dans Leprince et Lecoq pour l'analyse des fromages. Nous nous sommes servi de cette méthode pour doser notre caséine totale et la caséine transformée.

Le rapport

$$\frac{\text{Caséine transformée}}{\text{Caséine totale} - \text{Caséine transformée}}$$

permet facilement de différencier le vrai lait caillé de brebis bulgare des autres Yogourths.

Nous arrivons par les mêmes propriétés morphologiques et biochimiques ainsi constatées à différencier notre Bacterium bulgaricum nettement des Bacteriaceae, genre Escherichia, Castellani et Chalmers et nous nous croyons en droit de le ranger dans la tribu des Lactobacilleae, genre Lactobacillus Beijerinck.

CHAPITRE VII

L'emploi thérapeutique du lait caillé de brebis bulgare.

Nous avons déjà indiqué dans notre introduction que l'étude effectuée par nous sur le lait caillé de brebis bulgare a été en grande partie occasionnée par nos observations en Bulgarie de l'effet heureux de ce produit employé couramment par la population comme remède cicatriciel des plaies et des putréfactions en général.

Cet emploi thérapeutique a trouvé une base scientifique dans les expériences qui ont été effectuées par Kohendy, Belinovsky, Berdenikoff et Grekoff, qui ont pratiqué des expériences chimiques sur l'action antiseptique bactérienne du Bacillus bulgaricus. Meerovitch et Calinine ont essayé, en 1926, l'action antiseptique des cultures lactées bactériennes. Ces auteurs ont fait des expériences « in vitro » sur la flore bactérienne des maladies des oreilles. Ainsi des cultures (effectuées en présence du Bacterium bulgaricum) des microbes pathogènes des otites, tels que Staphylococcus aureus et albus, Streptococcus, Bacillus pseudodiphtericus, Bacillus proteus, Bacillus pyocianeus, Colibacille, Bacille de Friedlander, ont occasionnées la destruction de ce germe pathogène. A la suite de ces constatations, les auteurs ont injecté des cultures de Bacterium bulgaricum ou du maya dans les plaies et les fistules de ces maladies d'oreilles.

Tous ces auteurs expliquent l'action thérapeutique du Bacterium bulgaricum par sa capacité de production continuelle d'acide lactique qui, d'un côté, empêche les autres bactéries d'évoluer, se trouvant dans un milieu à concentration en ions H défavorable, et de l'autre côté favorise le pouvoir phagocytaire des leucocytes et stimule la cicatrisation cellulaire.

Kuper a traité avec succès des sinusites purulentes par introduction de cultures du Bacterium bulgaricum dans les cicatrices dentaires. Ces abcès ont guéri au bout de sept jours.

Carseki applique couramment la thérapie au moyen du bacille du lait caillé dans des cas de phlegmons graves. Ici, la prolifération et la granulation des tissus cellulaires est nettement stimulée et occasionne la guérison.

Dans la médecine vétérinaire, Mintcheff, entre d'autres, a effectué des recherches et a prouvé l'action thérapeutique heureuse dans des phlegmons, des blessures, des fistules de grands ou de petits animaux. Cet auteur constate surtout que le bacille bulgare réduit l'oedème et l'inflammation locale et agit d'autre part favorablement sur la température des animaux. La granulation des plaies sous l'action du bacille bulgare se développe vite et remplit en peu de temps de tissus frais les plaies. L'auteur remarque donc d'un côté une action stimulante sur la croissance des tissus musculaires et de l'autre une inhibition de la flore de putréfaction.

A la suite de ces constatations antérieures et ayant eu la chance de pouvoir collaborer avec un vétérnaire, nous avons nous-même pu effectuer deux expériences pour contrôler l'efficacité thérapeutique de nos cultures du Bacterium bulgaricum. Nous relatons sommairement ces deux expériences.

Dans un cas, il s'agit d'un phlegmon du sabot du pied droit arrière d'une vache, occasionné par une blessure de clou. Nous avons effectué le traitement suivant : ouverture de la plaie, grattage de celle-ci pour débarrasser le pus. Ensuite on introduit, le 23 mars 1937, une culture de Bacterium bulgaricum dans la plaie. On fait un pansement qu'on laisse pendant trois jours ; le 26 mars, on renouvelle le pansement et on constate déjà une diminution sensible de la putréfaction. On fait un nouveau grattage et on introduit une culture fraîche de Bacille bulgare. Après huit jours, l'animal a été complètement guéri, la pourriture du sabot a progressivement diminué ; à ce moment, la vache se sert de nouveau normalement de son pied sans boiter.

Dans un deuxième cas, il s'agissait d'une fistule chronique du cou d'un cheval. On constate un abcès profond, fort douloureux et une induration locale. On pratique tout d'abord un nettoyage superficiel de la fistule, on fait des lavages au moyen

d'une solution physiologique et on introduit ensuite des émulsions de Bacterium bulgaricum. Ces traitements sont répétés de trois en trois jours. Au bout de trois semaines, l'écoulement de la fistule a cessé et après un mois de traitement, la plaie est complètement guérie.

Nous croyons donc par ces expériences avoir pu démontrer l'effet très favorable du traitement au moyen du Bacterium bulgaricum dans des cas d'abcès, de phlegmons et de fistules chroniques.

CONCLUSION

Nous avons pu démontrer par des expériences préalables qu'il existe une différence notable entre le Yogourth préparé avec le lait de vache bulgare et celui effectué au moyen de lait de vache des pays occidentaux. Le rôle de la caséine dans le lait caillé bulgare ne peut pas être négligé et si on considère la proportion très élevée de ce corps dans le lait de brebis bulgare, on conçoit immédiatement que ce Yogourth doit avoir une valeur alimentaire de beaucoup supérieure à celle des autres produits similaires. Nous avons, d'autre part, pu démontrer que pour la préparation des Yogourths les analyses physico-chimiques des laits ne peuvent pas déterminer seules leur qualité pour la préparation des laits caillés. Nous avons ainsi effectué des expériences au moyen de lait de vache et de lait de brebis bulgare pour déterminer la catalase, la réductase, le pouvoir fermentatif spontané, l'indice leucocytaire et l'indice des souillures accidentelles de ces boissons.

Nous avons ainsi caractérisé, par ces propriété biochimiques, des laits ayant répondu entièrement aux exigences physico-chimiques comme étant inaptes à la préparation de lait caillé.

Mais le point essentiel de nos constatations est la forte présence spontanée de catalase libre dans les laits de brebis ayant par les autres analyses été trouvés absolument sains.

Par l'ensemble des analyses physico-chimiques bactériologiques et biochimiques, nous pouvons dire que les laits de brebis se distinguent des laits de vache par les caractères suivants: augmentation de la teneur en matière grasse et en caséine, teneur sensiblement identique en matière hydrocarbonée, augmentation de l'indice de catalase libre et épreuve de fermentation sensiblement plus stable.

Nous avons, par nos expériences bactériologiques, pu isoler les différents germes de la fermentation lactique présents dans le maya bulgare et nous avons pu cultiver par nos techniques spéciales en culture pure le Bacterium bulgaricum Metchnikoff, que nous avons étudié en tous détails au point de vue morphologique, biologique et biochimique.

A l'aide de ces cultures pures, nous avons préparé du lait caillé de vache et de brebis bulgare que nous avons étudié au point de vue de sa composition chimique et nous avons examiné, à l'aide de ces données, l'influence de différentes souches bactériennes sur la valeur alimentaire et commerciale de ces produits. On a ainsi pu démontrer que le lait caillé de brebis bulgare préparé uniquement avec le Bacterium bulgaricum donnait les résultats les plus favorables au point de vue valeur nutritive et qualité organoleptique. Ces faits sont tout à fait en accord avec les constatations antérieures de Grigoroff et de Kantardjieff.

Dans un dernier chapitre nous avons, grâce à la collaboration d'un vétérinaire, pu effectuer deux expériences pour mettre à l'épreuve la valeur thérapeutique du Bacterium bulgaricum, expériences qui ont été tout à fait démonstratives et qui corroborent les résultats favorables de Mintcheff.

Notre étude a pleinement démontré la grande différence qui existe entre le véritable lait caillé de brebis bulgare et les différents Yogourths préparés dans les autres pays. Nous voudrions donc terminer ce travail en citant les termes de Kvatchkoff au point de vue économique : « Le prix du lait de brebis en Bulgarie ne dépasse guère aujourd'hui 0 fr. 80 par litre et il existe dans ce pays une production annuelle de 2.500.000 hectolitres de lait de brebis en moyenne. Presque la moitié de ce produit pourrait être utilisé pour la fabrication de lait caillé de brebis bulgare. Celui-ci pourrait être utilisé à l'exportation donnant ainsi un facteur important et favorable pour l'économie agricole bulgare et mettant à la disposition des pays étrangers du véritable kvasseno mleko bulgare avec toutes ses qualités diététiques et thérapeutiques, soit pour les services des hôpitaux, soit pour les usages privés. »

BIBLIOGRAPHIE

Bactériologie et Laiterie. — As. KANTARDJIEFF, de la Faculté Agronomique de Sofia.

Bactériologie et Sérologie. — Prof. St. ANGUÉLOFF. Sofia.

BEHRENS & KROEMER. — *Mykologie der Weinbereitung,* dans : Lafar : *Handbuch der tech. Mykologie.* Vol. 5, Jena 1913.

BERTRAND & DUCHACEK. — *Action du ferment bulgare sur les principaux sucres.* Ann. Inst. Past. XXIII, 1909, p. 402.

BERTRAND & WEISWEILER. — *Action du ferment bulgare sur le lait:* Ann. Inst. Past. XX. 1906, p. 977.

Biochimie des Produits lactés. — Prof. G. C. INIHOFF. Russie.

Botanique spéciale. — Prof. St. PETROFF. Sofia.

CRISTOL. — *Précis de Chimie biologique médicale.* Masson, Paris 1935.

Chimie du Lait et des Produits du Lait, par le Prof. G. C. INIHOFF. Russie.

Chimie organique, par le Prof. As. ZLATAROFF.

FRITSCH & GUILLEMIN. — *Traité de Distillation des Produits agricoles et industriels.*

Etude sur le Lait fermenté comestible. Revue médicale de la Suisse romande. XXV, 1905, p. 714, par GRIGOROFF.

HAUDUROY. — *Dictionnaire des Bactéries pathogènes.* Masson, 1937.

HANSEN. — *Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie,* München, 1. u. 2. Heft.

HENNEBERG. — *Gährungsbakteriologisches Praktikum,* Berlin 1909.

Hygiène vétérinaire, par le Prof. PETROFF. Sofia.

Hygiène du Lait, par le Prof. DIKOFF. Sofia.

KHOUVINE-DELAUNEY. — *Digestion de la cellulose par la flore intestinale de l'homme.* Thèse Doct. Sc. Paris 1923.

KVATCHKOFF. — *Considérations sur le lait caillé bulgare de brebis.* Revue d'hygiène, T. 58, 1936, p. 454.

LEPRINCE & LECOQ. — *Guide pratique d'Analyses alimentaires.* Vigot, Paris 1930.

LUERSEN & KÜHN. — *Yogourth, die Bulgarische Sauermilch,* Central Bakter. u. Par. II° Abtlh. XX, 1908, p. 234.

MAZÉ. — *Les microbes dans l'industrie fromagère.* Ann. Inst. Past. XIX, 1907, p. 397.

Méthodes et techniques de l'étude des bacilles de lait caillé, par As. KANTARDJIEFF, de la Faculté Agronomique de Sofia.

NEUVILLE. — *Les ferments industriels de l'Extrême-Orient.* Paris 1902.

Recherches sur le lait caillé, par le Dr. M. JORDANOFF. Sofia.

OMELIANSKI. — *Die Milchsäuregährung, Handwörterbuch der Naturwissenschaften.* Korschelt-Teichmann, Jena 1913. Vol. 4, p. 519.

Revue médicale. — Sofia, 1932. Article du Dr. B. Abadjieff.
Revue médicale de Sofia. — Article du Dr. Zdravka Zontcheœa.
Sartory René. — *Etude de la dégradation de la cellulose chez quelques insectes xylophages.* Thèse Doct. Sc. Paris 1929.
Thèse scientifique. — Dr. Ognianoff. Sofia.
Traité de Chimie organique. — Prof. A. T. Holleman.
Will. — *Biologische Untersuchung und Begutachtung von Bierwürze.* München 1910.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION. 9

PREMIERE PARTIE

Historique

1er Chapitre : L'histoire de la Fermentation. 13
Fermentation alcoolique. 14

2e Chapitre : Fermentation cellulosique. 35

3e Chapitre : Fermentation acétique. 41

4e Chapitre : Fermentation butyrique. 45

5e Chapitre : Fermentation lactique. 49

6e Chapitre : Le Lait. 55

DEUXIEME PARTIE

Travaux personnels

1er Chapitre : Considérations générales sur le lait caillé bulgare de brebis. 63

2e Chapitre : Méthode employée pour l'analyse des laits et exposé des résultats. 67

3e Chapitre : Analyse bactériologique et biochimique des différents échantillons de lait. 77

4e Chapitre : Préparation du lait caillé bulgare. 83

5e Chapitre : Examen bactériologique des Yogourths. . 87

6e Chapitre : Recherches chimiques et bactériologiques sur le lait caillé bulgare. 93

7e Chapitre : L'emploi thérapeutique de lait caillé de brebis bulgare. 99

CONCLUSION. 103

Vu :

Strasbourg, le 6 Décembre 1937.

Le Président du Jury,

A. Sartory.

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 6 Décembre 1937.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

A. Sartory.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 9 Décembre 1937.

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

J. Dresch.